

**Neue Möglichkeiten der EBV-Diagnose mit Hilfe
rekombinanter Antigene**

Renate Fuchs aus München

1988

**Neue Möglichkeiten der EBV-Diagnose mit Hilfe
rekombinanter Antigene**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**vorgelegt von
Renate Fuchs aus München
1988**

**durchgeführt am
Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Abteilung Molekulare Virologie, Prof. Dr. Hans Wolf**

1. Berichterstatter

Prof. Dr. Werner Lubitz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Friedrich Schwarzfischer

Sonderberichterstatter:

Prof. Dr. Hans Wolf

Tag der mündlichen Prüfung:

14.11.1988

A. Verzeichnis der Abkürzungen	1
1. Biochemische und physikalische Abkürzungen	1
2. Chemische Abkürzungen	3
B. Zusammenfassung	5
C. Einleitung	7
1. Familie der Herpesviren	7
2. Klassifizierung der Herpesviren	8
2.1. α -Herpesviren	9
2.2. β -Herpesviren	9
2.3. γ -Herpesviren	9
2.3.1. B-zellspezifische Herpesviren (γ_1)	10
2.3.2. T-zellspezifische Herpesviren (γ_2)	10
3. Epstein-Barr Virus	10
3.1. Geschichtlicher Überblick	10
3.2. EBV-Genom und Antigenklassen	11
3.2.1. Epstein-Barr-assoziierte nukleäre Antigene (EBNA)	13
3.2.2. Durch T-Lymphozyten erkanntes Membranantigen (LYDMA)	14
3.2.3. Lytisches Stadium	15
3.2.4. Frühe Antigene (EA) und Viruskapsidantigene (VCA)	17
3.2.5. Membranantigene (MA)	18
4. Epstein-Barr Virus-assoziierte Krankheiten	19
4.1. Infektiöse Mononukleose	19
4.2. Burkitt's Lymphom (BL)	21
4.3. Nasopharynxkarzinom (NPC)	22

4.4. Chronische Epstein-Barr Virus-Infektionen	24
5. Diagnostik Epstein-Barr Virus-korrelierter Erkrankungen	24
5.1. Infektiöse Mononukleose	24
5.2. Abgelaufene Epstein-Barr Virus-Infektionen	25
5.3. Chronische Epstein-Barr Virus-Infektionen	26
5.4. Burkitt's Lymphom	26
5.5. Nasopharynxkarzinom	26
6. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	28

D. Material und Methoden **30**

1. Biologisches Material	30
2. Charakterisierung von Plasmid-DNA aus E.coli	31
2.1. Isolierung der DNA mittels Alkali-Methode (Maniatis et al., 1982)	31
2.2. Konzentrationsbestimmung der DNA	32
2.3. Restriktionsenzym-Verdau	32
2.4. DNA-Agarose-Gelelektrophorese	32
2.5. Isolierung der DNA aus dem Gel	33
2.6. DNA-Ligierung	34
2.7. Transformation von E.coli mit Plasmid-DNA	34
2.8. Charakterisierung der Rekombinanten	35
3. Reinigung der in E.coli exprimierten EBV-Proteine	36
3.1. Herstellung des Bakterienextraktes	36
3.1.1. pUCARG1140 (p138), pUC19LP1.9 (gp350/250), pUR290CXH580 (p150), pINDUAH375 (p150) und pUC18B640/620 (p150)	36
3.1.2. pUC9MBcE3.2 (p54)	37
3.2. Gelfiltrationschromatographie (pUCARG1140)	37
3.3. Ionenaustausch-Chromatographie	38
3.3.1. Anionenaustausch-Chromatographie	38
3.3.2. Anionenaustausch-Chromatographie (HPLC)	39

3.3.3. Kationenaustausch-Chromatographie	40
3.3.4. Kationenaustausch-Chromatographie mit S-Sepharose fast flow	40
3.3.5. Kationenaustausch-Chromatographie (HPLC)	41
3.4. Hydrophobe Chromatographie	41
3.5. Reversed Phase-Chromatographie (HPLC)	42
3.6. Affinitätschromatographie	42
4. Elektroelutionsverfahren	43
5. Zellkultur	44
6. Induktion	44
7. Virusreinigung und Superinfektion	44
8. In vivo Markierung von Proteinen	45
9. In vitro Translation	45
10. Immunpräzipitation	46
11. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	47
12. Färben der Proteine	48
12.1. Coomassie Brilliant Blue Färbung	48
12.2. Silberfärbung	49
13. Western Blot	49
13.1. Markierung mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern	50
13.2. Markierung mit Phosphatase-gekoppelten Antikörpern	50
13.3. Doppelmarkierung mit Peroxidase- und Phosphatase-gekoppelten Antikörpern	51
14. Isoelektrische Fokussierung	51
15. Zweidimensionale Gelelektrophorese	52
16. Bestimmung der Proteinkonzentration	53
16.1. Proteinbestimmung nach Lowry	53

16.2. Proteinbestimmung über die Optische Dichte	53
17. Auswertung über Densitometer	53
18. ELISA	54

E. Ergebnisse 55

1. Auswahl diagnostisch relevanter Proteine	55
2. Viruskapsidantigen p150	63
2.1. Lokalisation im EBV-Genom	63
2.2. Expression eines β -gal-Fusionsproteins	64
2.3. Reinigung von pUR290CXH580	66
2.4. Klonierung und Expression von pINDUAH375	72
2.5. Klonierung von pUC18B640/620	77
2.6. Expression von pUC18B640/620	80
2.7. Reinigung von pUC18B640/620	80
2.7.1. Trennung über den Kationenaustauscher Mono S	82
2.7.2. Trennung über Reversed Phase	84
2.7.3. Trennung über Mono Q	88
2.8. ELISA mit pUC18B640/620	90
3. Frühes Antigen p138	93
3.1. Lokalisation auf dem EBV-Genom	93
3.2. Subklone pUCARG601 und pUCARGNCO	95
3.3. Subklone pUCARG1140 und pUCARG680	95
3.4. Monoklonale Antikörper gegen pUCARG1140	101
3.5. Trennung pUCARG1140 über Ionenaustausch-Chromatographie	104
3.6. Reinigung von pUCARG1140 über zwei Stufen	107
3.7. Trennung über Mono Q (HPLC)	109
3.8. ELISA von pUCARG1140	111
4. Frühes Antigen p54	113
4.1. Lokalisation und Expression von pUC9MBcE3.2	113

4.2. Reinigung über Phenylsepharose	117
4.3. Reinigung über Mono Q	119
4.4. ELISA mit pUC9MBcE3.2	120
5. Membranproteine gp250/350	121
5.1. Lokalisation und Expression	121
5.2. Reinigung über Mono Q	124
5.3. ELISA mit pUC19LP1.9	125
6. Nukleäres Antigen EBNA1	127
7. ELISA von 100 menschlichen Seren (Doppelblindstudie)	128
8. Auswertung der Doppelblindstudie	140
 F. Diskussion	 144
 G. Literatur	 164
Eigene Veröffentlichungen	188
 Danksagung	 190
 Lebenslauf	 191

A. Verzeichnis der Abkürzungen

1. Biochemische und physikalische Abkürzungen

aa	Aminosäure
BL	Burkitt's Lymphom
bp	Basenpaar
cat	Chloramphenicol-Transferase-Gen
cm ³	Kubikzentimeter
Ci	Curie
CL	cross-linked (quervernetzt)
CM	Carboxymethyl
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
D	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
dhfr	Dihydrofolat-Reduktase-Gen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EA	frühes ("early") Antigen
EBNA	EBV assoziiertes nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
F	Faktor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
°C	Grad Celsius
g	Gramm
GC-Gehalt	Guanosin plus Cytosin Gehalt
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HSV	Herpes Simplex Virus

Ig	Immunglobulin
IE	Internationale Einheit
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IM	Infektiöse Mononukleose
ind.	induziert (mit Phorbolester und Buttersäure)
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
l	Liter
lacZ	β -Galaktosidase Gen
LYDMA	von Lymphozyten erkanntes Membranantigen ("lymphocyte detected membrane antigen")
M	molar
MA	Membranantigen
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	Boten ("messenger") Ribonukleinsäure
N	normal
NC	Nitrocellulose
nm	Nanometer
NPC	Nasopharynxkarzinom
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SI-Raji	superinfizierte Rajizellen
SP	Sulphopropyl
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VCA	Viruskapsidantigen
Vol.	Volumen
W	Watt

2. Chemische Abkürzungen

AMPER	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
β -Gal	β -Galaktosidase
BSA	Rinderserumalbumin
CNBr	Cyanbromid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
FKS	fötales Kälberserum
GTP	Guanosintriphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
NP 40	Nonidet P 40
PBS	phosphatgepufferte Salinelösung
PE	Phorbolester (Phorbol-12-myristat-13-acetat)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid



SDS	Natriumdodecylsulphat
TBS	Tris-/Kochsalzpuffer
TE	Tris-/EDTA-Puffer
TEN	Tris-/EDTA-/NaCl-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	TBS mit Tween 20
TTEN	TEN mit Tween 20
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

B. Zusammenfassung

Das Epstein-Barr Virus (EBV), der Erreger der Infektiösen Mononukleose, wird als mögliches kausales Agens für die Entstehung des Burkitt's Lymphoms (BL) und des Nasopharynxkarzinoms (NPC) betrachtet. Da die mit EBV korrelierten Tumorerkrankungen eine nicht unwesentliche Rolle im zentralafrikanischen (BL) und südchinesischen (NPC) Raum spielen, ist es wichtig, einen sicheren und schnellen Test für Massenuntersuchungen in der Diagnostik zu besitzen. Als äußerst wichtiger Punkt ist auch die Möglichkeit einer schnellen Therapiekontrolle zu sehen. Dieses schnelle Nachweisverfahren ist mit dem Aufbau eines ELISAs gegeben.

Ziel dieser Arbeit war es, diagnostisch relevante Antigene auszuwählen, sie zu klonieren, zu exprimieren und so zu reinigen, daß sie für einen ELISA geeignet sind. Dabei konnte teilweise auf bereits vorhandene rekombinante Antigene zurückgegriffen werden, einige Antigene mußten mit gentechnologischen Methoden selbst hergestellt werden. Wichtige Aspekte bei der Herstellung der rekombinanten Antigene waren hohe Expressionsraten und gute Antigenität. Außerdem mußten die antigenen Determinanten so gewählt werden, daß sie von möglichst allen positiven Seren erkannt werden. Bei der chromatographischen Reinigung der Konstrukte über HPLC oder im Normaldruckverfahren sollte die Reinheit der Produkte sowie die Erhaltung ihrer Antigenität gesichert sein. Die Spezifität der gereinigten Konstrukte mußte einwandfrei sichergestellt sein, bevor die Proteine als Antigene im ELISA eingesetzt werden konnten.

Es wurden insgesamt fünf Antigene aus allen Antigengruppen (EA, VCA, MA und EBNA) ausgewählt und ihre diagnostische Signifikanz zu den verschiedenen Krankheitsbildern untersucht. Die hergestellten rekombinanten Antigene waren in unterschiedlichem Maß für den ELISA geeignet. So besaßen einige Klone zu wenige bzw. zu kleine Fragmente der antigenen Determinanten. Sie konnten nicht für einen ELISA benutzt werden. β -gal-Fusionsproteine ("heterologe Fusionsproteine") waren nur

bedingt für den ELISA geeignet, da es leicht zu Reaktionen zwischen Antikörpern gegen β -Gal im Serum und dem β -Gal-Anteil der Fusionsproteine kommen konnte. Die Konstrukte, die keinen β -Gal-Anteil und dafür mehrere antigene Epitope ("autologe Fusionsproteine") enthielten waren nach der Reinigung im ELISA erfolgreich einsetzbar. Ein Klon besaß die gesamte kodierende Region von p54, so daß alle antigenen Stellen vorhanden waren ("Nicht-Fusionsprotein"). Im ELISA korrelierte die Reaktion mit diesem Klon auch am besten mit den Titern der Immunfluoreszenz. Zwei weitere Konstrukte waren ebenfalls Nicht-Fusionsproteine. Sie enthielten jedoch nicht die gesamte kodierende Region, sondern nur einen großen zusammenhängenden Bereich von 70% bzw. 43% des gesamten jeweiligen Proteins, so daß die Antigenität gesichert war. Alle fünf rekombinanten Antigene (pUCARG1140, pUC18B640/620, pUC9MBcE3.2, pUC19LP1.9 und pUC9KTB3.8) wurden auf mindestens 80% Reinheit gebracht und waren nach der Reinigung aktiv. Der mit diesen gereinigten Konstrukten aufgebaute ELISA hat sich nach Etablierung mit Standardseren in einer Doppelblindstudie bewährt und ist für die Diagnostik einsetzbar. Er bietet den Vorteil, daß er automatisierbar und maschinenlesbar ist. Die Ergebnisse können mit sämtlichen Parametern im Computer gespeichert werden und stehen späteren Studien zur Verfügung. Die herkömmliche indirekte Immunfluoreszenz unterliegt dagegen vielen subjektiven Einflüssen, insbesondere beim Ablesen der Ergebnisse unter dem Mikroskop, so daß die baldige Umstellung der Diagnostik von indirekter Immunfluoreszenz auf ELISA mit unbeschränkt zur Verfügung stehenden, standardisierten Antigenen wünschenswert wäre.

C. Einleitung

1. Familie der Herpesviren

Die Familie der Herpesviren (Herpesviridae) umfaßt mehr als achtzig Mitglieder. Als Wirt dienen ihnen Vertebraten (Primaten, Vögel, Reptilien, Amphibien, Fische) und Invertebraten (Austern), sowie Pilze. Die Herpesviren zählen zu den DNA-Viren und besitzen eine einzelne, doppelsträngige, lineare DNA mit $120-240 \times 10^3 \text{bp}$. Der GC-Gehalt liegt bei 32-75%. Das Virion mit einem Durchmesser von 120-200nm setzt sich aus vier Strukturkomponenten zusammen (Honess und Watson, 1977; Roizman und Batterson, 1985):

- a) Das Core mit seiner fibrillären Struktur, das die DNA enthält
- b) Das Kapsid, das einen Durchmesser von 100-110nm besitzt und als Ikosaeder mit 162 Kapsomeren (davon 150 hexamer und 12 pentamer) aufgebaut ist
- c) Das das Kapsid umschließende Tegument aus globulärem Material
- d) Das Envelope (die Hülle) aus Lipiden und Proteinen, die zum größten Teil glykosyliert sind (Roizman et al., 1981)

Die Virusinfektion erfolgt über die Bindung von Viruspartikeln an die Rezeptoren auf der Plasmamembran des Wirts. Die Hülle fusioniert dabei mit der Zellmembran, und das Kapsid wird in das Zytoplasma entlassen. Nach Freisetzung des Protein-/DNA-Komplexes erfolgt der Transport in den Zellkern (Nukleus). Typisch für die Herpesviren ist die kaskadenartige Regulation der Expression, wobei zuerst nur wenige sog. "immediate early" Gene transkribiert und translatiert werden. Diese Gene benötigen für ihre Aktivierung keine vorangehende Synthese von Virusproteinen. Die

immediate early Proteine schalten anschließend die Produktion der frühen ("early") Proteine an. Sie selbst werden in dieser frühen Phase wieder abgeschaltet. Zu den frühen Proteinen gehören virus-kodierte Enzyme, wie z.B. die DNA-Polymerase, die Thymidinkinase, die alkalische Desoxyribonuklease und die Ribonukleotid-Reduktase, die die Replikation der Virus-DNA im Zellkern ermöglichen. Nach der DNA-Replikation wird die Synthese der späten ("late") Proteine angeschaltet. In diesem Stadium werden vor allem Strukturproteine gebildet, die für die Verpackung und Ausschleusung der Virus-DNA verantwortlich sind ("budding"). Das fertige Virus wird dann durch das Endoplasmatische Retikulum nach außen transportiert (Hones und Roizman, 1974).

Nach der Primärinfektion persistieren Herpesviren meist lebenslang in ihrem Wirt. Schwere Erkrankungen sind bei den human-pathogenen Vertretern der Herpesviren für gesunde Erwachsene kaum zu erwarten. Zu Komplikationen kann es jedoch bei Neugeborenen und Immundefizienten kommen. Pränatale Infektionen mit Varizella zoster Virus (VZV) und Cytomegalievirus (CMV) können zu schweren Schädigungen des Embryos führen, wogegen Infektionen mit Herpes simplex oder Epstein-Barr-Virus keine Auswirkungen zeigten. (Luthardt, 1986). Eine Aktivierung von latenten Virusgenomen ist trotz vorhandener Antikörper möglich. Ein Beispiel dafür ist die Erstinfektion mit Varicella zoster (Windpocken) und die Sekundärinfektion mit Herpes zoster (Gürtelrose).

2. Klassifizierung der Herpesviren

Auf Grund ihres Wirtsbereichs, der Wachstumsrate, der Zytopathologie und ihrer Latenz werden die Herpesviren in drei Unterfamilien geteilt (Roizman et al., 1981):

2.1. α -Herpesviren

Die human-pathogenen Vertreter sind das Herpes simplex Virus Typ1 und 2 (HSV 1 und 2) und das Varicella zoster Virus (VZV). α -Herpesviren besitzen einen weiten Wirtsbereich und eine kurze Generationszeit. Sie verursachen vesikuläre Läsionen der Epithelzellen der Haut, der Augen, des Rachens und der Genitalien. Nach der Erstinfektion, die meist schon in den ersten drei Lebensjahren erfolgt, persistiert das Virus in den Nervenganglien, vor allem im Trigeminusganglion. Schwere Erkrankungen, wie z.B. eine akute Stomatitis oder eine Meningoenzephalitis mit einer Letalität bis zu 20%, finden sich bei Immunsupprimierten und bei Neugeborenen.

2.2. β -Herpesviren

Ihr human-pathogener Vertreter ist das Cytomegalievirus (CMV). In vivo und in vitro sind sie artspezifisch. Die Replikation in vitro ist meist nur in Fibroblasten möglich. Sie unterscheiden sich von den α -Herpesviren durch lange Generationszeiten. Die infizierten Zellen vergrößern sich und verschmelzen zu Riesenzellen mit einem Durchmesser bis zu $30\mu\text{m}$, was den β -Herpesviren auch die Bezeichnung Cytomegalieviren (griech. "cyto" Zelle und "megas" groß) eingebracht hat. Bei gesunden Erwachsenen kommt es zu einer ubiquitär persistierenden Infektion, meist ohne klinische Symptome. Sehr schwere Krankheitsbilder zeigen sich bei der kongenitalen Cytomegalie mit einer Letalität bis zu 90%, bei der postnatalen Infektion und bei immunsupprimierten Personen. Bei Transplantatempfängern ist eine der gefürchtetsten Komplikationen die durch CMV ausgelöste Hepatitis oder Pneumonie.

2.3. γ -Herpesviren

Die Infektion mit γ -Herpesviren kann in epitheloiden und lymphoiden Zellen sowie in Fibroblasten erfolgen. Die Virusvermehrung und Persistenz findet in Lymphozyten statt. γ -Herpesviren sind fähig, B- oder

T-Zellen zu immortalisieren. Da sie spezifisch für B- bzw. T-Lymphozyten sind, werden γ -Herpesviren nochmals unterteilt:

2.3.1. B-zellspezifischen Herpesviren (γ_1)

Tierpathogene Vertreter finden sich bei den Altweltaffen (Schimpansen, Paviane). Der einzige human-pathogene Vertreter der γ -Herpesviren ist das Epstein-Barr Virus (EBV). B-zellspezifische Herpesviren verursachen eine effiziente Immortalisierung von primären B-Lymphozyten, um Linien zu bilden, in denen die Virusgenom-Kopien als zirkuläre Episome mit eingeschränkter Genexpression enthalten sind (Nonoyama und Pagano, 1971).

2.3.2. T-zellspezifischen Herpesviren (γ_2)

Hier gibt es keine human-pathogenen Vertreter. Tier-pathogene Vertreter finden sich bei Neuweltaffen (Herpes Virus ateles und saimiri) und Geflügel (Marek Virus). T-zellspezifische Herpesviren persistieren, in dem sie eine inapparente Infektion in den T-Lymphozyten des natürlichen Wirts hervorrufen. In verwandten Spezies können polyklonale maligne lymphoproliferative Erkrankungen entstehen (Roizman et al., 1981).

3. Epstein-Barr Virus

3.1. Geschichtlicher Überblick

Ende der 50er Jahre bzw. Anfang der 60er beobachtete D. Burkitt das häufige Auftreten eines Tumors ("Burkitt's Lymphom") in Gesicht und Halsbereich bei Kindern in bestimmten Gebieten Zentralafrikas. Auffallend war dabei die Überschneidung der regionalen Verbreitung

dieser Krankheit mit der des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*. D. Burkitt vermutete daher einen Zusammenhang zwischen den beiden Infektionen (Burkitt, 1962). 1964 entdeckten jedoch Epstein und Barr (Epstein et al., 1964) sowie parallel dazu Pulvertaft (Pulvertaft, 1964) Viruspartikel in lymphoblastoiden Zellen, die aus einem Burkitt's Lymphom stammten, welche morphologisch und immunologisch den Herpesviren zuzuordnen waren (Henle und Henle, 1966).

Serologische Studien zeigten, daß es sich im Falle des Epstein-Barr Virus (EBV) um ein ubiquitäres Virus handelt. Über 90% der erwachsenen Bevölkerung, weltweit gesehen, besitzen Antikörper gegen dieses Virus. In den nachfolgenden Jahren konnten Henle und Henle zeigen, daß das Epstein-Barr Virus das klinische Bild einer Infektiösen Mononukleose (IM) erzeugt (Henle et al., 1968). Hohe Antikörpertiter gegen Epstein-Barr Virus, sowie der Nachweis von EBV-DNA in Nasopharynx-Karzinomen (NPC) ließen außerdem eine enge Assoziation zwischen NPC und EBV erkennen (zur Hausen et al., 1970; Nonoyama et al., 1973; Wolf et al., 1973, 1975; Desgranges et al., 1975; Andersson-Anvert et al., 1977).

3.2. EBV-Genom und Antigenklassen

Die lineare, doppelsträngige EBV-DNA besteht aus ca. 175 000bp und weist einen durchschnittlichen GC-Gehalt von 58% auf. An den Enden des Genoms befinden sich Tandem-Repeats von ca. 500bp Länge. Über diese terminalen Repeats kann im latenten Stadium eine Verknüpfung erfolgen, so daß zirkuläre Episome entstehen. In einzelnen Fällen kann die DNA aber auch in die zelluläre DNA integrieren (Henderson et al., 1983; Matsuo et al., 1984).

Im Inneren des Genoms befinden sich noch weitere Repeatstrukturen. Der größte Repeat kodiert im BamHI W-Fragment, erstreckt sich über 3000bp und variiert stark von Zelllinie zu Zelllinie (Baer et al., 1984). Die Zelllinie P3HR1 besitzt in diesem Repeat eine große Deletion, die sich in die Bereiche rechts davon bis zum NotI-Repeat fortsetzt. Die Zelllinie P3HR1, die aus der Burkitt's Lymphom (BL)-Zelllinie Jijoye stammt, hat durch diese Deletion ihre transformierenden Eigenschaften verloren (Raab-

Traub et al., 1978; Bornkamm et al., 1982). Virus aus P3HR1-Zellen geht besonders leicht in den lytischen Zustand über und eignet sich daher gut für die Infektion von anderen EBV-Zelllinien, die im latenten Stadium sind, wie z.B. Raji-Zellen. Raji-Zellen besitzen defekte DNA-Moleküle, die sog. het-DNA, die keine Replikation zulassen, aber für die Superinfektion nötig sind (Heston et al., 1982; Rabson et al., 1983; Miller et al., 1984).

Ein kleinerer Repeat mit 708bp liegt im BamHI K-Fragment und besteht aus einer Kombination der Triplets GGG, GCA und GGA. Dieser Bereich kodiert für ein Polymer aus Glycin und Alanin, dem großen Epitop von EBNA1 (Heller et al., 1982; Hennessy und Kieff, 1983; Rumpold et al., 1987). Die Zahl der Repeats ist in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich, so daß das Molekulargewicht von EBNA1 zwischen 68kD und 85kD schwankt (Strnad et al., 1981; Hennessy und Kieff, 1983). EBNA1 scheint bei der Virusreplikation beteiligt zu sein. Plasmide, die den Replikationsursprung des Virus besitzen, können nämlich nur dann in permissiven Zellkulturen gehalten werden, wenn sie auch das BamHI K-Fragment besitzen (Yates et al., 1985).

Die benachbarten Sequenzen des NotI- (124bp) bzw. PstI- (103bp) Repeats, die sich im BamHI H bzw. B' befinden, zeigen untereinander eine Homologie über einen Bereich von 2000bp (Hudewentz et al., 1982; Dambaugh und Kieff, 1982; Hayward et al., 1982; Jeang und Hayward, 1983). Der GC-Gehalt dieser beiden Repeats liegt bei 84% und ist damit wesentlich höher als der durchschnittliche GC-Gehalt des gesamten Genoms.

Bei der Transkription des EBV-Genoms kann eine Unterteilung in latenten Zustand und lytischen Zyklus vorgenommen werden. Im latenten Stadium werden nur zwei Antigenklassen, nämlich EBNA (Epstein-Barr nuclear antigen) (Reedman und Klein, 1973; Strnad et al., 1981) und LYDMA (lymphocyte detected membrane antigen) exprimiert (Svedmyr und Jondal, 1975).

3.2.1. Epstein-Barr-assoziierte nukleäre Antigene (EBNA)

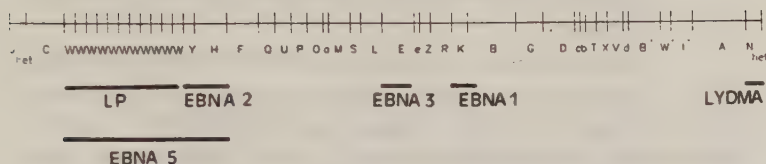


Abb. 1 Schematische Darstellung des EBV-Genoms mit den BamHI-Schnittstellen und die Zuordnung der Hauptexons von EBNA1, 2, 3 und 5 sowie LYDMA und LP zu den BamHI-Fragmenten. EBNA4 ist noch nicht auf dem Genom lokalisiert

EBNA1, das bei der Virusreplikation eine Rolle spielt, bindet, mit Ausnahme des Y-Chromosoms, während der Metaphase an die Chromosomen (Reedman und Klein, 1973; Grogan et al., 1981). EBNA1 wirkt in trans auf die zelluläre DNA-Polymerase ein, die im latenten Stadium für die Replikation verantwortlich ist (Yates et al., 1985; Rawlins et al., 1985).

EBNA2, das in den BamHI-Fragmenten W, Y, H transkribiert wird (Strnad et al., 1981), ist bei der Initiation der viral induzierten B-Zell-Transformation beteiligt, indem es als direkter oder indirekter trans-Aktivator von CD23, einem Oberflächenmarker bei der B-Zellaktivierung, wirkt (Wang et al., 1987a). Die Isolierung von EBNA2 aus verschiedenen Zelllinien (B95-8 und AG876 als Prototypen) läßt 2 Typen erkennen (EBNA2A und EBNA2B). TypA-Transformanten zeigen in Kultur ein signifikant schnelleres Wachstum als die B-Transformanten. Im Mikroskop sieht man neben Verklumpungen einen dichten Rasen an lebensfähigen, einzelnen Zellen. TypB-Transformanten bilden wesentlich größere Verklumpungen, und man sieht nur noch wenige Einzelzellen (Rickinson et al., 1987).

EBNA3 mit einem Molekulargewicht von 142kD wird im BamHI E kodiert. Es scheint ähnlich wie EBNA1 und 2 an der latenten Infektion und der Transformation beteiligt zu sein (Hennessy et al., 1986).

EBNA4 mit einem Molekulargewicht von 150 - 160kD ist ebenso wie EBNA1-3 ein DNA-bindendes Protein. In B95-8 Zellen, einer Epstein-Barr Virus transformierten Affenzelllinie, bzw. in lymphoblastoiden (LCL)-Zellen, die mit Virus aus B95-8 Zellen transformiert sind, wird EBNA4 in der Gelelektrophorese häufig in zwei Banden aufgetrennt. Dies läßt auf einen post-translationalen Prozeß oder auf zwei "splicing" Formen der mRNA schließen. EBNA3 und 4 werden auch in Zelllinien, die eine EBNA2 Deletion (z.B. Raji) besitzen, exprimiert (Kallin et al., 1986).

EBNA5 kodiert wie EBNA2 in der BamHI W, Y, H-Region. Das Molekulargewicht liegt zwischen 41 und 70kD. Obwohl EBNA2 und 5 dasselbe 3'-Ende besitzen und auch an derselben polyA-site enden, besteht keine Homologie in der Aminosäuresequenz. EBNA5 wird in lymphoblastoiden Zelllinien exprimiert, nicht jedoch in BL-Zelllinien (Dillner et al., 1986).

Die EBNA mRNA Leader-Sequenz, welche mindestens zwei Proteine (EBNA1 und 2) mit nicht überlappenden offenen Leserahmen translatiert, kodiert für ein 40kD großes Leader Protein (LP), das in allen latent infizierten Zellen zu finden ist. Dieses Protein wird in P3HR1 und anderen BL-Zelllinien exprimiert, nicht jedoch in der Marmosetlinie B95-8 und in Raji-Zellen (Wang et al., 1987b).

3.2.2. Durch T-Lymphozyten erkanntes Membranantigen (LYDMA)

Die zweite Antigenklasse, die in latent infizierten Zellen exprimiert wird, ist das Membranprotein LYDMA. Es kodiert im BamHI N und besteht aus zwei Introns (Fennewald et al., 1984). LYDMA, das auf der Oberfläche von B-Zellen zu finden ist, wird

von den T-Zellen während der zellulären Immunabwehr erkannt. Das Protein konnte inzwischen auch mit Antiseren nachgewiesen werden (Hennessy et al., 1984; Modrow und Wolf, 1986).

3.2.3. Lytisches Stadium

Beim Übergang von der Latenz in den lytischen Zyklus wird fast das ganze Genom transkribiert. Dabei läuft ein kaskadenartiger Prozeß ab, der mit dem des HSV Typ1 vergleichbar ist (Honess und Roizman, 1974; Wolf und Roizman, 1978). Hierbei werden zuerst die sog. "immediate early" Proteine exprimiert, die dann die Synthese der frühen ("early") Proteine anschalten. Nach der Replikation der DNA werden die späten ("late") Proteine, das sind die Strukturproteine des Viruskapsids und der Membran, gebildet. Die Zuordnung der Proteine zu den bestimmten Stadien erfolgt über eine selektive Hemmung der Translation und Transkription (Bayliss und Wolf, 1981). Bei der Hemmung der Proteinbiosynthese mit Cycloheximid und gleichzeitiger Infektion der Zellen werden die mRNAs für acht der ca. 40 viralen Proteine transkribiert. Der Cycloheximidblock wird dann aufgehoben und eine weitere Transkription durch Zugabe von Actinomycin D unterbunden, so daß nur diese mRNA translatiert wird. Die entstehenden immediate early Proteine werden über SDS-PAGE identifiziert (Abb. 2).

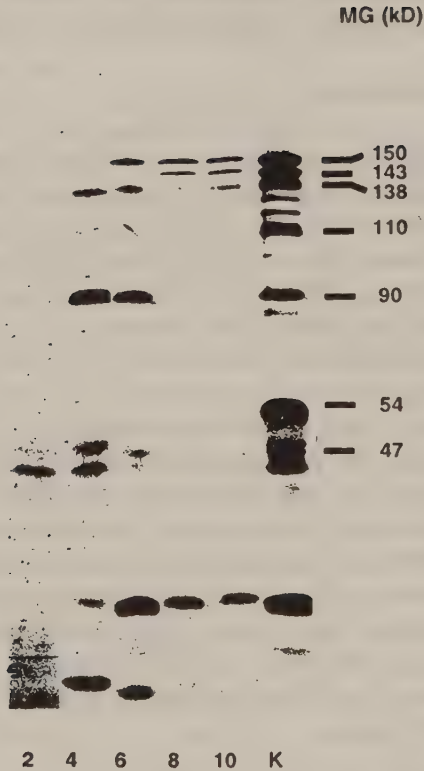


Abb. 2 Immunpräzipitation von SI-Raji-Zellen mit Hemmung der Proteinbiosynthese durch Zugabe von Cycloheximid 2-10h nach Infektion; als Antikörper wurde ein Pool von NPC-Seren verwendet; 2, 4, 6, 8, 10 = Stunden nach Infektion, K = Kontrolle ohne Cycloheximid

Als Beweis, daß zur Transkription der frühen mRNAs die immediate early Proteine notwendig sind, wurden Aminosäureanaloga (Azetidin anstatt Prolin, Canavanin anstatt

Arginin) eingebaut. Durch diese Störung können die immediate early Proteine nicht mehr die Synthese der frühen Proteine anschalten. Nach Entfernung des Canavanins aus den Zellen unter gleichzeitiger Hemmung der Transkription durch Actinomycin D erfolgt keine Synthese früher Proteine. Daraus ist zu schließen, daß zur Transkription früher mRNAs die immediate early Proteine notwendig sind (Bayliss und Wolf, 1982, 1987). Die Synthese der späten Proteine ist abhängig von dem Vorhandensein der frühen Proteine und der Replikation der viralen DNA. Eine Hemmung der viralen DNA-Polymerase mit Phosphonoessigsäure (PAA) führt dazu, daß bestimmte späte Proteine bei einer Infektion mit hoher Multiplizität nur in geringen Mengen produziert werden. Auf bestimmte andere späte Proteine hat dieser Block keinen Einfluß (Bayliss und Wolf, 1981). In diesem Punkt unterscheidet sich das Epstein-Barr Virus von dem HSV Typ1.

3.2.4. Frühe Antigene (EA) und Viruskapsidantigene (VCA)

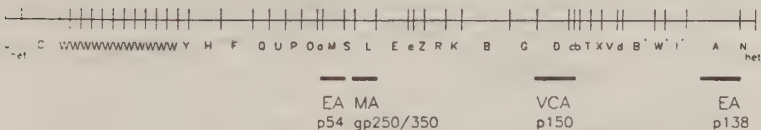


Abb. 3 Schematische Darstellung des EBV-Genoms mit der Zuordnung der Hauptexons von EA, VCA und MA zu den BamHI-Fragmenten

Die Identifizierung von zwei weiteren Antigenklassen, den frühen Antigenen (EA) und den Viruskapsidantigenen (VCA), erfolgte über Immunfluoreszenz bzw. Immunpräzipitation. In der Immunfluoreszenz werden Raji-Zellen (Pulvertaft, 1965) und P3HR1-Zellen (Pulvertaft, 1964; Hinuma und Grace, 1967) als EBV-positive Linien benutzt, BJA-B Zellen (Menezes et al., 1975) dienen als Negativkontrolle. Raji-Zellen bilden nach chemischer

Induktion nur EBNA- und EA-Proteine. Es fehlt ihnen auf Grund einer Deletion im BamHI A-Fragment mindestens das EA-Protein p138. P3HR1 bildet als virusproduzierende Zelllinie dagegen alle Proteine. Die EA-Proteine wurden von Henle et al., 1971, in eine EA-D ("diffuse") und eine EA-R ("restricted") Form unterteilt. EA-D befindet sich sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern. EA-R ist dagegen nur im Zytoplasma vorhanden und wird bei einer Fixierung mit Methanol zerstört.

Als EA-Proteine wurden unter anderen ein Protein mit dem Molekulargewicht von 54kD (BamHI M), das einen 47kD großen Vorläufer besitzt, und ein Protein mit 138kD Größe (BamHI A) identifiziert (Pearson et al., 1983; Seibl und Wolf, 1985). Beide EA-Proteine sind stark DNA-bindend.

VCA-Proteine werden nach der DNA-Replikation produziert (s. 3.2.3.). Als Proteine des Viruskapsids (VCA) wurden bisher zwei Transkripte identifiziert und dem Genom zugeordnet: p150 (BamHI cD) und p143 (BamHI C). Induzierte Raji-Zellen (Mueller-Lantzsch et al., 1979; Bayliss et al., 1983; Kallin und Klein, 1983) produzieren auf Grund ihrer Deletionen im Gegensatz zu induzierten P3HR1-Zellen (Kallin et al., 1979; Kawanishi et al., 1981; Edson und Thorley-Lawson, 1981) keine späten Proteine.

3.2.5. Membranantigene (MA)

Als letzte Antigenklasse sind die Membranantigene zu erwähnen. Sie sind auf der Zytoplasmamembran von virusproduzierenden Zellen und auf der Hülle lokalisiert. Der Membranantigenkomplex besteht unter anderem aus den Polypeptiden mit einem Molekulargewicht von 350, 250, 140, 108 und 85kD. Außer dem 140kD-Protein sind alle Komponenten glykosyliert (Qualtiere und Pearson, 1979, 1980; Thorley-Lawson und Edson, 1979; Edson und Thorley-Lawson, 1981). gp350 und gp250 kodieren beide im BamHI L-Fragment (Hummel et al., 1984). Durch partielles

Spleißen entstehen jedoch unterschiedlich große Transkripte (Beisel et al., 1985). Über 50% des Molekulargewichts der beiden größten Komponenten bestehen aus N- oder O-glykosidisch gebundenen Zuckern (Edson und Thorley-Lawson, 1983; Morgan et al., 1984). Antikörper gegen diese Proteine wirken virus-neutralisierend (Hoffmann et al., 1980; Thorley-Lawson und Geilinger, 1980; Strnad et al., 1982). Bei Immunisierungsversuchen erzeugen sie neutralisierende Antikörper, die gegen den Proteinteil gerichtet sind (Morgan et al., 1984) und die vor einer Infektion schützen (North et al., 1982; Epstein et al., 1985).

4. Epstein-Barr Virus-assoziierte Krankheiten

4.1. Infektiöse Mononukleose

Die Erstinfektion mit Epstein-Barr Virus erfolgt in der dritten Welt im frühen Kindesalter und verläuft häufig subklinisch. In der westlichen Welt kommt es meist erst im Alter von 15-25 Jahren zu einer Infektion, wobei in etwa 50% der Fälle (Niederman et al., 1970; Biggar et al., 1978; Henle und Henle, 1979) klinische Symptome auftreten. Die Infektiöse Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber) führt zu Lymphknotenschwellungen, Vergrößerung der Milz und veränderten Leberfunktionen. In einigen Fällen können auch Herz, Lunge, Nieren und das zentrale Nervensystem involviert sein. Einen fatalen Verlauf hat die Erkrankung bei Patienten mit einem XLP-Syndrom (X-linked lymphoproliferative syndrome) oder mit einer Immunsuppression (Purtilo, 1980, 1984; Hamilton et al., 1980; Purtilo et al., 1982). Es ist dabei keine Unterdrückung der polyklonalen Proliferation der infizierten B-Lymphozyten durch Suppressor-T-Zellen mehr möglich (Sullivan et al., 1980).

Bei der seropositiven Normalbevölkerung wird die Proliferation der infizierten Zellen durch zytotoxische T-Zellen, Antikörper, NK-Zellen (natural killer cells) und unspezifische Resistenzfaktoren, wie z.B.

Interferon, in Schach gehalten (Svedmyr und Jondal, 1975; Haynes et al., 1979; Tosato et al., 1979).

Die primäre Epstein-Barr Virus-Infektion erfolgt durch den Eintritt des Virus in den Rachenraum. Unbekannt ist, wie es von dort in die Epithelzellen der Ohrspeicheldrüse gelangt (Wolf et al., 1984), wo es dann repliziert wird. Das Virus infiziert auch B-Lymphozyten, die im peripheren Blut nachweisbar sind. In diesen infizierten Lymphozyten wird häufig das Membranantigen LYDMA aktiviert, was zur Eliminierung der B-Lymphozyten durch anti-LYDMA T-Killerzellen führt (Modell nach Wolf et al., 1986). Im Frühstadium einer akuten Infektion sind diese anti-LYDMA T-Killerzellen noch nicht vorhanden, so daß eine hohe Zahl von EBV-positiven Zellen nachweisbar ist. Diese Zellen können in ein lytisches Stadium übergehen und virale Partikel bzw. Antigene freisetzen. Dabei kommt es zur Bildung von Antikörpern und zu einer neuerlichen Infektion von B-Lymphozyten. Während dieser Phase, die der ersten Krankheitswoche entspricht, besitzen 5-20% der B-Zellen EBNA. Eine Woche später sind nur mehr weniger als 2% der B-Lymphozyten EBNA positiv. Es kommt jedoch nicht zu einer vollkommenen Eliminierung der EBV-positiven sowie der virusproduzierenden Zellen, so daß eine Reaktivierung möglich ist (Gerber und Monroe, 1968). Während der Primärinfektion kommt es zu einer starken B-Lymphozytenproliferation. Anschließend folgt im Zusammenspiel mit Interferon eine Vermehrung der T-Lymphozyten, die die Proliferation der B-Lymphozyten unterdrücken (Thorley-Lawson, 1981). Ca. 0.01% der B-Lymphozyten von EBV-positiven Personen enthalten latent das Virus. Ein Anstieg dieser infizierten Zellen wird durch das Zusammenwirken von permanent virusproduzierenden Zellen in der Ohrspeicheldrüse, dem darauffolgenden Anschalten von LYDMA und der Eliminierung durch T-Lymphozyten vermieden (Moss et al., 1978; Rickinson et al., 1979, 1980).

4.2. Burkitt's Lymphom (BL)

Epidemiologische Studien zeigen, daß die Inzidenz für Epstein-Barr Virus-assoziierte Burkitt's Lymphome in Zentralafrika und Neuguinea am höchsten in der ganzen Welt ist. In diesen Gebieten tritt der Tumor besonders häufig bei Kindern (10 Fälle/100000/Jahr) auf. Außerhalb Afrikas ist das Burkitt's Lymphom mit weniger als 3% an der Gesamtzahl der Tumore bei Kindern beteiligt (Lenoir et al., 1984). Vergleichsweise dazu treten andere B-Zell-Lymphome in allen Gegenden mit gleicher Häufigkeit auf (O'Connor et al., 1985; Philip et al., 1982). Tumorbiopsien in Gebieten mit einer hohen Malaria-Durchseuchung sind in 96% der Fälle EBV-DNA positiv (Geser et al., 1983), wogegen die Untersuchungen in nicht Malaria-verseuchten, benachbarten Gebieten nur in 25% der Fälle eine positive EBV-DNA Reaktion zeigen. EBV-negative Burkitt's Lymphome dürften auf der ganzen Welt mit gleicher Häufigkeit vorkommen. Das Auftreten der Malaria scheint damit eine Rolle bei der Korrelation zwischen Epstein-Barr Virus und Burkitt's Lymphom zu spielen, was jedoch andere Faktoren, die zur Tumorentwicklung beitragen können, nicht ausschließt. Weiterhin spricht für die Annahme, daß das Epstein-Barr Virus für die Entstehung des Burkitt's Lymphoms mitverantwortlich ist, die Transformation von B-Lymphozyten durch das Virus in der Gewebekultur, die Entstehung von Lymphomen im Versuch mit Primaten, ein stark erhöhter Antikörpertiter ca. 2 Jahre vor Auftreten des Lymphoms und die Abhängigkeit der Therapieerfolge vom Antikörpermuster (Henle, 1971).

Das Burkitt's Lymphom befällt im Primärstadium oft den Kieferbereich, vor allem bei älteren Patienten aber auch Nieren, Leber und Darm. Der Tumor wächst extrem schnell, läßt sich jedoch im frühen Stadium gut therapieren (Burkitt, 1967). Rezidive sind einer Therapie oft nicht mehr zugänglich und führen immer zum Tod.

Zytogenetische Studien von Burkitt's Lymphomen zeigen regelmäßig chromosomale Veränderungen. Dabei kommt es zu einer Translokation des Chromosoms 8, das an seinem langen Arm das Onkogen c-myc trägt, mit den Chromosomen 2, 14 oder 22 (Manolov und Manolova, 1972). Die

Chromosomen 2, 14 und 22 besitzen jeweils ein Immunglobulingen (2: Ig κ ; 14: Ig heavy; 22: Ig λ) (Miyoshi et al., 1979, 1981; Bernheim et al., 1981; Mark-Vendel et al., 1983; Taub et al., 1982)). Der Bruchpunkt auf dem Chromosom 8 ist bei allen Translokationen in der Nähe des c-myc Gens. Das c-myc Gen kommt damit beim Rearrangement an die aktive Stelle des Immunglobulingens und wird wahrscheinlich stärker exprimiert, so daß eventuell eine maligne Proliferation der B-Lymphozyten möglich ist (Hayday et al., 1984; Taub et al., 1984). Diese chromosomalen Translokationen finden sich jedoch nicht nur beim EBV-assozierten Burkitt's Lymphom, sondern auch bei anderen malignen B-Lymphozyten. Bei der Infektiösen Mononukleose wird ein solches Rearrangement in vivo nicht beobachtet.

Ungeklärt ist bis jetzt, wie bei der Entstehung des Burkitt's Lymphoms die zelluläre Immunabwehr umgangen wird. Möglicherweise spielt sowohl das LYDMA als auch der HLA-Typ eine Rolle, da in Burkitt's Lymphom-Zellen eine Expressionsveränderung dieser Membranproteine (vielleicht LYDMA) festgestellt wurde. Die Zellen können dann in vivo nicht mehr vom Immunsystem erkannt werden (Markert et al., 1987; Modrow und Wolf, 1986; Wolf et al., 1986).

4.3. Nasopharynxkarzinom (NPC)

Dieser Tumor im Nasenrachenraum zählt zu der häufigsten Tumorart im südchinesischen Raum (40 Fälle/100000/Jahr). Weltweit spielt das NPC mit einer Inzidenz von 0.3 Fälle/100000/Jahr keine große Rolle. Epidemiologische Studien an Südchinesen, die in China leben, und an emigrierten Südchinesen zeigen, daß in der ersten Generation bei den Emigranten diegleiche Häufung an EBV-positiven NPC auftritt (Ho, 1975). Bei späteren Generationen, die sich mit anderen Rassen durchmischt haben, sinkt das Risiko an NPC zu erkranken (Shanmugaratnam und Muir, 1967; Muir, 1971). Die Vermutung liegt nahe, daß genetische Faktoren (HLA-Typ) und Umwelteinflüsse bei der Erkrankung eine Rolle spielen (Nevo et al., 1971; Shanmugaratnam, 1971;

Ho, 1972; Williams und de The, 1974). Männer erkranken unabhängig von Rasse oder geographischer Lage häufiger als Frauen.

Die Tatsache, daß die Transformation von menschlichen Lymphozyten durch Epstein-Barr Virus über TPA, einen Diterpenester, stimuliert werden kann (Yamamoto und zur Hausen, 1979), führte zu Untersuchungen von phorbolesterhaltigen Pflanzen und Medikamenten in Südchina und im tropischen Afrika (Zeng et al., 1983b). Die geographische Verbreitung der diterpenhaltigen Euphorbiaceen stimmt vollkommen mit der geographischen Verteilung der Mortalitätsrate durch NPC überein (Hirayama und Ito, 1981). Im Mäuseversuch wirkt ein hoher Anteil an pflanzlichen Diterpenen als Tumorpromotor. Diese Pflanzenextrakte verstärken die Epstein-Barr Virus-Infektion und Transformation, die Virusproduktion und die virale Aktivierung (Ito et al., 1983). EBV-Zelllinien fusionieren unter Zugabe solcher Promotoren mit EBV-negativen Zellen (Bayliss und Wolf, 1980). Neben den Diterpenen aus Pflanzen stehen auch Prokaryonten im Verdacht, Tumorpromotoren zu produzieren. Dabei handelt es sich um Indolalkaloide, wie z.B. Indolactam (aus *Streptovercillium blastomyceticum*), Teleocidin (aus *Streptomyces mediodicidicus*) oder Lyngbyatoxin (aus *Lyngbya majuscula*), sowie um Buttersäure und andere kurzkettige Fettsäuren (aus *Fusobacterium nucleatum*) (Fujiki et al., 1979; 1981; Ito und Yanase, 1980).

In allen NPC sind EBV-DNA (Wolf et al., 1973; Klein et al., 1974) und in den Seren der Patienten sind Antikörper gegen Epstein-Barr Virus (Henle und Henle, 1976b; Zeng et al., 1979) nachweisbar. Die entarteten Zellen haben epitheloide Struktur. Da das Virus auf einen bestimmten Rezeptor, den C3d-Rezeptor, der B-Lymphozyten angewiesen ist, um in die Zellen zu gelangen (Fingeroth et al., 1984; Frade et al., 1985), müssen B-Lymphozyten und Epithelzellen fusionieren. Dies ist durch den engen Kontakt im Nasenrachenraum möglich (Glaser, 1983). Patienten, die ein NPC entwickeln, zeigen schon lange vor einer klinischen Manifestation erhöhte Titer gegen bestimmte virale Antigene. Im frühen Stadium ist dieser Tumor ebenso wie das Burkitt's Lymphom noch gut therapierbar.

Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt im Stadium I bei 93.3%, Stadium II bei 74.7% und sinkt dann stark ab (Wolf et al., 1987).

4.4. Chronische Epstein-Barr Virus-Infektionen

Chronisch verlaufende Epstein-Barr Virus-Infektionen lassen sich klinisch und serologisch nur schwer erfassen. Die Symptome sind oft nur allgemeiner Art: Müdigkeit, Abgeschlagenheit, leichtes Fieber, schwache Anzeichen einer Mononukleose (Masucci et al., 1981; Tobi et al., 1982; Tosato und Blaese, 1985; Borysiewicz et al., 1985). Möglicherweise kommt es auch zu psychischen Veränderungen. Die humorale sowie die zelluläre Immunantwort entspricht nicht dem normalen Verlauf einer infektiösen Mononukleose im Heilungsprozeß. Es scheint jedoch einen Zusammenhang zwischen den klinischen Symptomen, dem Immunprofil und der Suppressor-T-Zellaktivität im Blutkreislauf der Patienten zu geben.

5. Diagnostik Epstein-Barr Virus-korrelierter Erkrankungen

5.1. Infektiöse Mononukleose

Die Epstein-Barr Virus-Diagnostik wird im allgemeinen über Immunfluoreszenzteste bzw. antikomplementäre Immunfluoreszenzteste durchgeführt. In der akuten Krankheitsphase sind IgM-Antikörper gegen VCA nachweisbar. Diese Antikörper werden sehr früh entwickelt und verschwinden nach 1-3 Monaten wieder.

IgG-Antikörper gegen VCA werden nach ca. 2 Wochen gebildet. Ein Titeranstieg um mehr als eine Titerstufe bei den Verlaufskontrollen beweist in den meisten Fällen eine primäre Epstein-Barr Virus-Infektion. Diese Antikörper sinken später etwas ab, bleiben jedoch mit einem Titer von ca. 1:40 lebenslang erhalten. IgG-Antikörper gegen die R-Komponente von EA (Horwitz et al., 1975) erscheinen später als die Antikörper gegen VCA. EA-Titer sind meist wesentlich niedriger als VCA-Titer. Sie müssen bei einer akuten Infektion auch nicht unbedingt

aufzutreten. Antikörper gegen EBNA1 sind bei einer frischen Infektion nicht oder nur selten nachweisbar (Henle et al., 1974; Fleisher et al., 1979).

Bei der Infektiösen Mononukleose entwickeln sich Antikörper mit einer Spezifität gegen Erythrozyten verschiedener Tierspezies (sog. heterophile Antikörper), die meist der IgM-Klasse zuzuordnen sind (Carter, 1966; Lee und Davidsohn, 1972). Diese Antikörper-Bildung wird wahrscheinlich durch die durch Epstein-Barr Virus stimulierten B-Lymphozyten induziert. Diese schon 1932 von Paul und Bunell beschriebenen heterophilen Agglutinine werden durch Rindererythrozyten aus dem Patientenserum entfernt (Paul und Bunell, 1932; Davidsohn und Nelson, 1969). Sie sind spezifisch für die Infektiöse Mononukleose und werden im Agglutinationstest bestimmt (Lee et al., 1968; Galloway, 1969). Der Prozentsatz an falsch-negativen Ergebnissen vor allem bei Kleinkindern liegt bei bis zu 15%, so daß der Test nur zusammen mit einem spezifischen EBV-Antikörper-Test aussagekräftig ist.

Antikörper gegen die Membranproteine bzw. neutralisierende Antikörper werden in der Routinediagnostik bisher nicht erfaßt. In wissenschaftlichen Studien wurden jedoch Antikörper gegen das Membranprotein gp85, nicht jedoch gegen die großen Membranproteine gp350/250 gefunden (Thorley-Lawson und Geilinger, 1980; North et al., 1982). Diesen Ergebnissen widersprechen neuere Befunde, die in 94% der Fälle Antikörper gegen das Membranprotein gp250 bei der ^{125}J -markierten Immunpräzipitation zeigen (Jilg und Wolf, 1985).

5.2. Abgelaufene Epstein-Barr Virus-Infektionen

Abgelaufene Epstein-Barr Virus-Infektionen unterscheiden sich von den akuten Infektionen durch das Fehlen der IgM-Antikörper. IgG-Antikörper gegen VCA finden sich in allen Titerstufen. Antikörper gegen EBNA1 sind regelmäßig vorhanden.

5.3. Chronische Epstein-Barr Virus-Infektionen

Soweit bis jetzt überhaupt Aussagen über eine chronische Infektion getroffen werden können, scheint es unterschiedliche Gruppen von chronisch infizierten Patienten zu geben. Die eine Gruppe zeigt die Serodiagnostik einer abgeschwächten Infektiösen Mononukleose. Die andere Gruppe zeigt kaum heterophile Antikörper und IgM-Antikörper; sie besitzt Antikörper gegen EBNA1 (Du Bois et al., 1984). IgG-Antikörper gegen die Membranantigene gp350/250 können eventuell als diagnostisch signifikant angesehen werden, da sie häufig bei chronischen EBV-Infektionen fehlen (Jilg und Wolf, 1985).

5.4. Burkitt's Lymphom

Patienten mit einem Burkitt's Lymphom weisen bereits 2 Jahre vor Auftreten des Tumors erhöhte IgG-Titer gegen VCA und gegen die R-Komponente des EA auf (Henle et al., 1973a; Henle und Henle, 1977). Die Serologie kann damit Personen als tumorgefährdet einordnen und dementsprechend überwachen. Die anti-R Titer lassen eine Vorhersage für den Therapieerfolg zu. Patienten, die nach der Chemotherapie keine oder nur mehr niedere Antikörpertiter gegen EA-R besitzen, haben seltener einen Rückfall und damit eine bessere Überlebenschance. Nach dem Erscheinen des Tumors ist die klinische Diagnose so eindeutig, daß eine serologische Absicherung der Diagnose nicht mehr nötig ist.

5.5. Nasopharynxkarzinom

Patienten, die ein NPC entwickeln oder bereits besitzen, können serologisch leicht erfaßt werden. Sie besitzen deutlich erhöhte IgG-Titer gegen VCA, EA-D und MA. Zusätzlich haben sie hohe IgA-Antikörpertiter gegen VCA und EA-D (Henle und Henle, 1976a,b; Ho et al., 1976), wodurch sie sich von Patienten mit einer Infektiösen Mononukleose oder einem Burkitt's Lymphom unterscheiden. Diese hohen IgA-Titer sind möglicherweise durch die Lage des Primärtumors in den

submukösen Bereichen des Nasenrachenraums bedingt. Hohe IgA-Antikörpertiter vor allem gegen VCA sind schon lange vor Entdeckung eines Tumors nachweisbar (Henle und Henle, 1970, 1976a). Die IgA-Antikörper eignen sich daher besonders gut für Verlaufskontrollen und Therapiestudien. Die 5-Jahres-Überlebensrate ist bei rechtzeitiger Diagnose und Therapie wesentlich erhöht (Zeng und de The, 1985; Wolf et al., 1987). Eine Abnahme der IgA-Titer nach einer Chemotherapie deutet auf die Reduzierung des Tumors hin. Ein erneuter Titeranstieg zeigt ein Rezidiv an (Henle et al., 1973b, 1977; Lynn et al., 1973; de The et al., 1975; Henle und Henle, 1976 a,b).

Studien in Hochrisikogebieten von China zeigen deutlich den Vorteil von Massenuntersuchungen in diesen Gegenden. Normalerweise werden die Patienten erst bei der klinischen Manifestation des Tumors serologisch getestet, d.h. in einem Stadium, in welchem die Tumore schon oft Metastasen gebildet haben. Die Prognose für diese Patienten ist dann relativ schlecht. Bei Reihenuntersuchungen von klinisch unauffälligen Personen in diesen Risikogebieten wurden 1-5% VCA-IgA positive Seren entdeckt (Zeng et al., 1982, Zeng, 1985). Die Personen mit IgA-Antikörpern gegen VCA wurden dann weiter beobachtet und als NPC gefährdet eingestuft. Tatsächlich wurde 10-41 Monate nach Feststellung der VCA-IgA-Titer in 2-10% der Fälle ein Tumor gefunden (Zeng et al., 1985). Die Bestimmung von IgA-Antikörpern gegen EA bzw. MA (Pi et al., 1987; Zhu et al., 1986) steigert die Möglichkeit einer gezielten Diagnostik, da in den Hochrisikogebieten 1-3% der Erwachsenen immer IgA-Antikörper gegen VCA besitzen, und somit die alleinige Bestimmung der Antikörper gegen VCA nicht ausreicht. Bei Personen mit IgA-Antikörpern gegen EA liegt die Entdeckungsrate von NPC bei 30-43% (Zeng et al., 1985). Für die stark NPC-gefährdeten Gebiete Chinas kann daher die Bestimmung des IgA-Titers gegen VCA als Voruntersuchung dienen. Die dabei als positiv entdeckten Personen werden dann regelmäßig auf die Entwicklung von IgA-Antikörpern gegen EA hin untersucht. Treten diese Antikörper auf oder erhöht sich ihr Titer, so ist dies in einem von 2 oder 3 Fällen ein Zeichen für eine Tumorentwicklung.

Die IgA-Antikörpertiter gegen VCA bzw. EA wurden früher mit der indirekten Immunfluoreszenz (Desgranges und de The, 1978) oder mit enzymatischen Tests (Zeng et al., 1982) bestimmt. Eine wesentliche Steigerung der Empfindlichkeit kann durch Radioimmunteste oder durch vorheriges Entfernen der IgG-Antikörper mit Sephadex-gekoppeltem Protein A erreicht werden (Zeng et al., 1983a; Pi et al., 1987). Dadurch werden in 100% der Fälle die IgA-Antikörper gegen MA, die dieselbe Aussagekraft wie die IgA-Antikörper gegen EA besitzen, erfaßt.

6. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Epstein-Barr Virus-Diagnostik wird bis zum heutigen Zeitpunkt meist mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik durchgeführt. Diese Methode ist jedoch äußerst arbeitsintensiv und teuer. Da für Epstein-Barr Virus keine permissiven Zelllinien existieren, werden Zelllinien benutzt, die nur in sehr geringem Maß EBV-Antigene produzieren. Dementsprechend müssen große Mengen an Kulturen für die Diagnostik gezüchtet werden. Diese Zellkulturen befinden sich bei der Aufarbeitung für die Immunfluoreszenz in stets unterschiedlichen Wachstumsstadien. Es ist daher unmöglich von standardisierten Präparaten auszugehen. Außerdem lassen sich Mutationen oder auch bakterielle Verunreinigungen nie ganz ausschließen.

Die für den Test benötigten Objektträger werden für die Bestimmung der Antikörper gegen EA mit induzierten Raji-Zellen und für die Bestimmung der Antikörper gegen VCA mit induzierten P3HR1-Zellen beschichtet. Als Negativkontrolle dienen BJA-B-Zellen. Nachdem die Zellen mit dem jeweiligen EBV-Antigen auf den Objektträgern fixiert sind, werden sie mit den Patientenserum inkubiert. Anschließend folgt eine zweite Inkubation mit einem Fluoresceinisothiocyanat- (FITC) gekoppelten Antikörper gegen menschliches Immunglobulin. Danach werden die Präparate eingebettet. Alle diese Vorgänge werden durch mehrmalige Waschschrte unterbrochen. Die einzelnen Felder auf den Objektträgern müssen unter dem Mikroskop ausgewertet werden. Für die mikroskopische Auswertung wird daher gut geschultes Personal benötigt, da es oft unspezifische Fluoreszenzen gibt, die

durch zelluläre Immunreaktionen hervorgerufen werden. Die Auswertung ist somit immer subjektiv und die Ergebnisse sind untereinander kaum vergleichbar. Bei dieser Technik gibt es somit keine Möglichkeit der Automatisierung. Sie ist daher nicht nur vom Materialaufwand, sondern auch vom Personalaufwand her gesehen teuer.

Um die Epstein-Barr Virus-Diagnostik zu vereinfachen und zu objektivieren, wurde in dieser Arbeit nach neuen Testmöglichkeiten gesucht. Hierbei sollte zuerst eine Auswahl von diagnostisch relevanten Antigenen getroffen werden. Um die aufwendige Zellkultur auszuschließen, sollten die ausgewählten und dem EBV-Genom zugeordneten Antigene zusammen mit Herrn Dr. Motz in Bakterien kloniert und exprimiert werden. Nach der Auswahl der stabilen Expressionsprodukte über Western Blots sollten dann als Schwerpunkt dieser Arbeit die rekombinanten Antigene p150VCA, p138EA und p54EA gereinigt werden. Die Reinigung sollte die Antigenität der Proteine weitestgehend erhalten. Die gereinigten rekombinanten Antigene sollten überdies in ausreichender Menge vorhanden sein, so daß sich die anschließenden ELISA-Tests (enzyme-linked immunosorbent assay) mit standardisiertem Material durchführen ließen. Geringe Verunreinigungen durch restliche Bakterienproteine wurden toleriert, wenn sie die Spezifität des Tests nicht störten. Die gereinigten Antigene sollten dann in ELISA's gegen verschiedene Patientenseren getestet werden. Es sollte dann eine Korrelation zwischen Immunfluoreszenztest und ELISA gesucht werden.

D. Material und Methoden

1. Biologisches Material

Die für die Versuche verwendeten Zelllinien stammten aus dem Max-von-Pettenkofer Institut. Sie unterliegen einer ständigen Kontrolle und werden sowohl für Forschungszwecke als auch für die diagnostischen Tests eingesetzt. Im Einzelnen wurden benutzt:

BJA-B (Menezes et al., 1975): EBV-negative Burkitt's Lymphom (BL)-Zelllinie

P3HR1 (Pulvertaft, 1964; Hinuma und Grace, 1967): BL-Zelllinie, die durch Subklonierung aus der Jijoye-Zelllinie entstand. Sie produziert spontan Virus und ist gut chemisch induzierbar. Isoliertes Virus aus P3HR1 kann B-Lymphozyten nicht mehr transformieren. Es kann jedoch EBV-negative B-Lymphozyten infizieren bzw. latent infizierte B-Lymphozyten superinfizieren.

Raji (Pulvertaft, 1965): latente BL-Zelllinie, die chemisch induziert bzw. mit Virus aus P3HR1 superinfiziert werden kann.

B95-8 (Miller et al., 1972): Affenzelllinie. Es wurden Marmoset-Lymphozyten in vitro mit Virus aus der Zelllinie 833L (humane B-Zelllinie von einem Patienten mit einer Infektiösen Mononukleose) transformiert.

B95-8 produziert wie P3HR1 spontan Virus und ist gut induzierbar.

Die für die Klonierung benutzten pUC-Plasmide stammten von M. Bröker und J. Messing, Minnesota (Vieira und Messing, 1982; Yanisch-Perron et al., 1985).

Die für die Reinigung der EBV-Antigene benutzten klonierten Bakterien (pUR290CXH580, pUCARG1140, pUC19LP1.9, pUC9MBcE3.2) stammten von M. Motz (Dissertation 1986) aus der Arbeitsgruppe, die Klone pINDUAH375 und pUC18B640 620 wurden im Rahmen dieser Dissertation angefertigt.

Der monoklonale Antikörper R3 wurde freundlicherweise von G. Pearson (Pearson et al., 1983) zur Verfügung gestellt.

Die Kaninchenserum und monoklonalen Antikörper gegen p150 und gp350/250 stammten aus der Arbeitsgruppe.

Die bei der Immunpräzipitation, den Western Blots und ELISAs benutzten Patientenserum stammten aus der diagnostischen Abteilung des Max-von-Pettenkofer Instituts.

Zusätzliche Seren von NPC-Patienten wurden von Y. Zeng, Institute for Virology, Chinese Academy for Preventive Medicine, Beijing, China, zur Verfügung gestellt.

Die 100 Patientenserum aus der Doppelblindstudie stammten von Prof. Morgenstern und Dr. Koldovsky, HNO-Klinik, Düsseldorf.

2. Charakterisierung von Plasmid-DNA aus E.coli

2.1. Isolierung der DNA mittels Alkali-Methode (Maniatis et al., 1982)

Die Bakterien wurden in L-Broth (1% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 0.5% NaCl) mit 50µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C unter Schütteln hochgezogen. Anschließend wurden 1.5ml der Übernachtskultur mit einer Eppendorf-Tischzentrifuge für 1min. in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in 100µl einer kalten Lösung aus 50mM Glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris pH8.0, 4mg/ml Lysozym aufgenommen und für 5min. bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde dann eine frisch zubereitete Lösung aus 0.2N NaOH und 1% SDS dazugemischt und alles für 5min. auf Eis inkubiert. Danach wurden 150µl einer kalten Lösung aus 3M Kalium⁺ und 5M Acetat pH4.8 zupipettiert, gemischt und abermals für 5min. auf Eis gestellt. Das Bakterienlysat wurde in einer Eppendorf-Zentrifuge für 5min. pelletiert, und der Überstand mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (48:48:4) ausgeschüttelt. Die DNA wurde anschließend mit dem doppelten Volumen an Ethanol gefällt, mit 70% eiskaltem Ethanol gewaschen, lyophilisiert und in 50µl TE-Puffer (10mM Tris-HCl pH7.4, 1mM EDTA) aufgenommen. Für den Restriktionsenzym-Verdau wurden 10-20µl dieser DNA-Lösung eingesetzt.

Wurde für weitere Klonierungen eine größere Menge DNA benötigt, so wurde diese aus 100ml Übernachtskultur isoliert. Sie wurde nach derselben Methode mit entsprechend größerem Volumen sämtlicher Lösungen präpariert.

2.2. Konzentrationsbestimmung der DNA

Für die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde ein Absorptionsspektrum von 320-220nm im Photometer aufgenommen. Die Mengenbestimmung erfolgte über die Differenz von der Extinktion bei 257nm und 320nm. Die dabei resultierende OD wurde einer Konzentration von 50µg/ml dsDNA gleichgesetzt.

2.3. Restriktionsenzym-Verdau

Die DNA wurde gemäß den Angaben der jeweiligen Hersteller mit verschiedenen Restriktionsenzymen bzw. Kombinationen davon verdaut. Waren dabei ~~verschiedene~~ Salzkonzentrationen des Puffers notwendig, so wurde zuerst mit dem Enzym, das die niedrigere Salzkonzentration benötigte, verdaut. Die Inkubationstemperatur war 37°C, die Dauer der Inkubation betrug im Durchschnitt 4h. Die geschnittene DNA wurde für die Gelelektrophorese in 1/10Vol. Auftragspuffer (50% Saccharose, 50mM EDTA, 20mM Tris pH7.5, 5mg/ml Bromphenolblau, 5mg/ml Xylencyanol) aufgenommen.

2.4. DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Stücke wurden in waagerechten Flachbett-Gelapparaturen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gelmatrix (Volumen 300ml) bestand aus 0.8-1.5% Agarose in Tris/Acetat-Puffer (40mM Tris, 20mM Natriumacetat, 2mM EDTA, pH7.8). Die Agarosekonzentration richtete sich nach der Größe der gesuchten DNA-Fragmente. Die Gele wurden bereits beim Gießen mit Ethidiumbromid, das zur Erkennung der DNA-Banden im UV-Licht dient, versetzt. Um die Molekulargewichte zuzuordnen

zu können, wurde eine mit HindIII geschnittene λ -DNA (Sigma) als Marker benutzt. Die Elektrophorese wurde über Nacht bei 30V durchgeführt. Nach Beendigung des Laufs wurden die Gele unter UV-Licht betrachtet, mit einer Polaroid-Kamera fotografiert und ausgewertet. Für eine DNA-Konzentrationsbestimmung bzw. für die Überprüfung der Reinheit wurden sog. Minigele (BRL), die ein Gelvolumen von 25ml besitzen, benutzt. Die Laufzeit beträgt bei diesen Gelen nur ca. 1h bei 60V.

2.5. Isolierung der DNA aus dem Gel

Für eine quantitative Gewinnung der mit Restriktionsenzymen verdauten DNA-Fragmente wurde die DNA in mehrere nebeneinander liegende Taschen des Agarosegels pipettiert und aufgetrennt. Die Fragmente wurden dann unter UV-Licht als ein Block mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Agarosestücke wurden zusammen mit etwas Elektrophoresepuffer in einen vorher mit TE-Puffer ausgekochten Dialyseschlauch gegeben. Die Schläuche wurden an beiden Enden verknotet oder mit Klammern verschlossen. Anschließend wurden sie in die Elektrophoresekammer zurückgelegt, wobei die Orientierung der Gelstücke der ursprünglichen Wanderungsrichtung der DNA im Gel entsprechen muß. Nach 2-3 Stunden Elektrophorese wurde die Elution unter UV-Licht überprüft. Wenn die Elution abgeschlossen war, wurde die an der Dialysemembran sitzende DNA durch Reiben von der Wand entfernt und abpipettiert. Der Dialyseschlauch wurde mit etwas TE-Puffer nachgewaschen, und der Puffer mit dem Eluat vereinigt.

Die Reinigung und Konzentrierung der DNA erfolgte über Elutip-d Säulen (Schleicher & Schuell). Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden die Säulen auf 5ml Spritzen gesteckt, mit 1-2ml des Hochsalz-Puffers (1M NaCl, 20mM Tris pH7.4, 1mM EDTA) gewaschen. Dann wurde die Säule mit 5ml Niedersalz-Puffer (0.2M NaCl, 20mM Tris pH7.4, 1mM EDTA) equilibriert. Nach dem Aufstecken eines 0.45 μ m-Celluloseacetat-Filters zwischen Spritze und Säule wurde langsam die DNA-Lösung durch die Säule gedrückt. Bei niederer Salzkonzentration

bindet die DNA an das Säulenmaterial. Die Säule wurde nochmals mit 2-3ml Niedersalz-Puffer gewaschen und der Filter entfernt, bevor die DNA mit 0.4ml Hochsalzpuffer von der Gelmatrix wieder abgelöst wurde. Die eluierte DNA wurde zweimal mit Isoamylalkohol ausgeschüttelt, um Ethidiumbromid zu entfernen, in eiskaltem Ethanol gefällt, zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, lyophilisiert und in 20µl TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde in einem Minigel geprüft.

2.6. DNA-Ligierung

Die für die Ligierung eingesetzte DNA-Menge ist abhängig von dem Größenverhältnis der Fragmente zueinander und den Restriktionsenzym-Schnittenden. Normalerweise wurde bei einer Ligierung mit einem pUC-Vektor 0.1µg Vektor-DNA eingesetzt. Das DNA-Fragment, welches in den Vektor gesetzt werden sollte, wurde in ca. 3fachem molarem Überschuß dazugegeben. Die Zugabe von 1-2 Einheiten T4-DNA-Ligase (Boehringer Mannheim) unterstützt die Ausbildung einer Phosphatverknüpfung zwischen dem 3'-OH-Ende und dem 5'-Phosphatende der beiden DNAs. Die Ligierung wurde bei 14°C für 12-24h in einem Puffer mit 50mM Tris-HCl pH7.6, 10mM MgCl₂, 500µg/ml Rinderserumalbumin und 10mM Dithiothreitol durchgeführt. Wird der Vektor nur mit einem Enzymschnitt linearisiert oder die Ligierung mit glatten DNA-Fragmentenden ("blunt end") durchgeführt, ist die Möglichkeit der Bildung von Religanden gegeben. Für diesen Fall wurde der Vektor nach dem Restriktionsenzymverdau mit Phosphatase behandelt und die eingesetzte Vektormenge auf 0.05µg reduziert. Gleichzeitig wurde die Menge an inserierender DNA und an T4-DNA-Ligase erhöht.

2.7. Transformation von E.coli mit Plasmid-DNA

Für die bakterielle Transformation wurden kompetente Zellen benötigt (Hanahan, 1983). Dazu wurden 3ml einer Übernachtskultur von JM109 in L-Broth auf eine 100ml Kultur vergrößert und bis zu einer Zelldichte von

0.5–0.7 OD ($\lambda=600\text{nm}$) bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wurde dann für 10min. auf Eis gestellt und in einem A6.24 Rotor (Kontron) für 10min. bei 5000upm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 30ml kaltem Acetat-Puffer (10mM Kaliumacetat pH6.4, 100mM KCl, 45mM MnCl_2 , 10mM CaCl_2 , 3mM Hexamminkobalttrichlorid, 10% Glycerin) resuspendiert. Nach 15min. Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut zentrifugiert (5min./5000upm/4°C), und das Pellet in 8ml Acetat-Puffer (s.o.) resuspendiert. Die Suspension wurde für 5min. auf Eis gestellt, 280 μl Dimethylsulfoxid dazugegeben, abermals 5min. auf Eis gestellt und 280 μl Dimethylsulfoxid hinzugefügt. Die kompetenten Bakterien wurden in 400 μl Portionen (entspricht 2 Ligierungsansätzen) geteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Pro 20 μl Ligierungsansatz wurden 200 μl kompetente Zellen verwendet. Die Mischung wurde in ein Glasröhrchen überführt und für 30min. auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Röhrchen für 2.5min. auf 42°C erwärmt, 1ml L-Broth (ohne Antibiotika) hinzugefügt und für 1–2h bei 37°C geschüttelt. Je 150 μl der Zellsuspension wurden auf L-Broth-Agarplatten, die 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin und 40 $\mu\text{g/ml}$ X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Nachweis der Bakterien mit Insert erfolgte über den hydrolytischen Abbau von X-Gal zu Galaktose und dem blauen Farbstoff 5-Brom-4-chlor-indigo. Beim Einbau fremder DNA in die Klonierungsstelle kann das lacZ Gen mit X-Gal nicht mehr kooperieren, so daß kein Farbstoff mehr produziert werden kann. Es entstehen statt blauer Kolonien weiße auf den Agarplatten.

2.8. Charakterisierung der Rekombinanten

Von den selektionierten Kolonien (s. 2.7.) wurden ca. 10 Kolonien von den Platten isoliert und jeweils in 5ml L-Broth mit Ampicillin über Nacht bei 37°C geschüttelt. Aus 1.5ml der Übernachtskultur wurde dann die DNA wie unter Punkt 2.1. beschrieben gewonnen.

Auf Grund der Sequenzdaten und damit der Restriktionsenzymchnittstellen wurden für die Charakterisierung der

rekombinanten Klone solche Enzyme ausgewählt, die eine eindeutige Aussage über das Vorhandensein und die Orientierung des Inserts zuließen. Der Verdau und die Agarose-Gelelektrophorese wurden dann wie bereits in 2.3. und 2.4. beschrieben durchgeführt.

3. Reinigung der in *E.coli* exprimierten EBV-Proteine

3.1. Herstellung des Bakterienextraktes

1µl einer in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Bakterienkultur wurde in 100ml L-Broth mit Ampicillin über Nacht bei 37°C hochgezogen. Am nächsten Morgen wurde die Kultur auf 1l vergrößert und bei einer OD von 0.7 ($\lambda=600\text{nm}$) mit 1mM IPTG für 2h induziert. Die Bakterien wurden dann für 10min. bei 5000upm in einem A6.9 Rotor (Kontron) abzentrifugiert.

3.1.1. pUCARG1140 (p138), pUC19LP1.9 (gp350/250), pUR290CXH580 (p150), pINDUAH375 (p150) und pUC18B640/620 (p150)

Das Pellet aus 3.1. wurde in 20mM Tris-HCl pH7.5 resuspendiert, 60mM EDTA und 2mg/ml Lysozym hinzugefügt und für 30min. bei 37°C inkubiert. Das Lysat wurde noch zweimal für jeweils 5min. im Eis bei 200W mit einem Ultraschallgerät (Braun) behandelt. Um einen Teil der *E.coli* Proteine schon über ihre Löslichkeit in Harnstoff zu entfernen, wurde das Lysat im Verhältnis 1:2 mit 8M Harnstoff/20mM Tris-HCl pH7.5 versetzt und für 15min. bei Raumtemperatur stehengelassen. Die in *E.coli* exprimierten EBV-Proteine blieben bei dieser Harnstoffkonzentration (4M) unlöslich und konnten bei 17000upm/30min. in einem A8.24 Rotor abzentrifugiert werden. Das Pellet wurde in 8M Harnstoff/20mM Tris-HCl pH7.5/0.5% β -Merkaptoethanol unter Zusatz von 0.01% NaN_3 und 1mM PMSF über Nacht bei Raumtemperatur gelöst. Die Proteinlösung wurde

für 30min. bei 17000upm und 10°C abzentrifugiert, der Überstand mit einem 0.45µm Sterilfilter (Millipore) filtriert und mit Hilfe der Säulenchromatographie aufgetrennt.

3.1.2. pUC9MBcE3.2 (p54)

Das Pellet aus 3.1. wurde in PBS aufgenommen, resuspendiert und für 20min. bei 10000upm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 87% Glycerin mit 0.25% NP-40 und 0.25% β -Merkaptoethanol für 30–60min. auf einem Vortex bei Raumtemperatur gemischt. Für die Bakterienlyse wurden 20mM Tris-HCl pH7.5/150mM KCl/64mM EDTA mit 2mg/ml Lysozym dazugegeben, und die Suspension bei 37°C für 1h inkubiert. Das Lysat wurde zweimal 5min. beschallt und anschließend für 30min. bei 17000upm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit KCl bis zu einer Endkonzentration von 1M versetzt, 1mM PMSF und 1% Trasyolol hinzugefügt und über Nacht in 50% Ammoniumsulfat bei 4°C gefällt. Nach der Zentrifugation (30min./17000upm) befand sich bei einer guten Induktion das Protein im Pellet, bei einer schlechten Induktion im Überstand. Dieses Pellet wurde in 20mM Tris-HCl pH7.5 gelöst und mit Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 25% versetzt. Bei Trübung wurde nochmals zentrifugiert (30min./17000upm), und der Überstand nach Filtration für die Säulenchromatographie benutzt.

3.2. Gelfiltrationschromatographie (pUCARG1140)

Die Proteinlösung wurde über Sepharose CL-4B (Pharmacia), das die Proteine nach Molekulargewicht auftrennt und einen Trennbereich von 6×10^4 – 2×10^7 D besitzt, geschickt. Das Gelbett der Säule (Pharmacia) besaß eine Höhe von 80cm und einen Durchmesser von 5cm, d.h. ein Volumen von 1571cm³. Die Säule wurde in 8M Harnstoff/20mM Tris-HCl pH7.5 für ca. 6h equilibriert, die Probe in einem Volumen von 15ml aufgetragen

und der Lauf über Nacht in 8M Harnstoff/20mM Tris-HCl pH7.5 durchgeführt. Die Fraktionsgröße betrug 6ml; es wurden 120 Fraktionen gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden photometrisch bei $\lambda=280\text{nm}$ vermessen, die positiven Fraktionen wurden im SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und über Färbung mit Coomassie blue oder über Western Blot ausgewertet. Die Säule wurde anschließend noch für mehrere Stunden zuerst mit Puffer, dann mit Wasser/0.02% NaN_3 gespült und aufbewahrt.

3.3. Ionenaustausch-Chromatographie

Die Auswahl des Ionenaustauschers erfolgte nach der Löslichkeit des jeweiligen Proteins bei einem bestimmten pH-Wert. Lag dieser oberhalb des isoelektrischen Punktes des zu reinigenden Proteins, wurde ein Anionenaustauscher, lag er unterhalb des isoelektrischen Punktes, ein Kationenaustauscher eingesetzt. Für die Proteine mit Arginin-Anteil war eine Trennung über Kationenaustauscher auf Grund der starken positiven Ladung der Arginine vorgesehen. Wegen der Unlöslichkeit der einzelnen Arginin-Konstrukte im sauren pH-Bereich wurde zusätzlich eine Trennung über Anionenaustauscher versucht.

3.3.1. Anionenaustausch-Chromatographie

Als Anionenaustauschermaterial wurde DEAE-Trisacryl M (LKB) verwendet. Das Material wurde je nach Aufbereitung der Proben in 8M Harnstoff/20mM Tris-HCl pH7.5 (bei pUCARG1140, pUCARG601 und pUCARG680) oder in 50mM Tris-HCl pH8.5 (bei pUC9MBcE3.2) equilibriert. Nach Auftragen der Probe wurde die Säule mit dem Ausgangspuffer gespült, bis die Basislinie wieder erreicht wurde (Elution der ungebundenen Proteine). Anschließend wurde ein Salzgradient angelegt (bis 1M NaCl bzw. 1M KCl), d.h. die gebundenen Proteine wurden eluiert und in 5ml Fraktionen gesammelt. Nach Beendigung des Laufs wurde die Säule mit 0.1M NaOH regeneriert und in jeweiligem Puffer

equilibriert. Die eluierten Proben wurden über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ausgewertet.

3.3.2. Anionenaustausch-Chromatographie (HPLC)

Die Auftrennung erfolgte über eine Mono Q HR5/5-Säule (Pharmacia), die als funktionelle Gruppe eine Trimethylaminomethyl-Gruppe enthält. Als Ausgangspuffer (A) wurde wie bei der Normaldruckchromatographie 8M Harnstoff/20mM Tris-HCl pH7.5 mit 0.5% Trasylol für die Auftrennung der Proteine aus pUCARG1140, pUR290CXH580, pUC9MBcE3.2, pUC19LP1.9 und pUC18B640/620 verwendet. Der Hochsalzpuffer (B) bestand aus 8M Harnstoff/20mM Tris-HCl pH7.5/1M NaCl mit 0.5% Trasylol. Es wurde für pUCARG1140 ein Stufengradient angelegt, da er eine bessere Auftrennung als ein linearer Gradient lieferte:

0-5min.	100% A	0% B
5-15min.	100-90% A	0-10% B
15-20min.	90% A	10% B
20-30min.	90-75% A	10-25% B
30-31min.	75-0% A	25-100% B
31-40min.	0% A	100% B

Für pUR290CXH580 und pUC18B640/620 wurde ein linearer Gradient benutzt:

0-15min.	100% A	0% B
15-45min.	100-0% A	0-100% B
45-50min.	0-100% A	100-0% B

Der Gradientenverlauf wurde über einen pH-/Ionenmonitor überprüft. Das Auftragsvolumen war jeweils 2ml, die Flußrate betrug 1ml/min. Die Fraktionen wurden im Durchfluß-Photometer bei $\lambda=226\text{nm}$ vermessen und das dazugehörige Spektrum

aufgenommen. Die Fraktionen von jeweils 1ml wurden im SDS-Polyacrylamid-Gel identifiziert.

3.3.3. Kationenaustausch-Chromatographie

Es wurde sowohl mit CM (Carboxymethyl-) Sephadex C-50 als auch mit SP (Sulphopropyl-) Sephadex C-50 (Pharmacia) gearbeitet. Die Proben wurden dabei in 8M Harnstoff/20mM Citratpuffer pH4.0 (pUCARG601, pUCARG680 und pUCARG1140) oder in 8M Harnstoff/20mM Phosphatpuffer pH5.7 (pUCARG680) aufgenommen. Die Säule wurde in demselben Puffer equilibriert, und die Proben aufgetragen. Nach gründlichem Spülen mit dem Ausgangspuffer wurde ein Salzgradient bis 1M NaCl angelegt. Gebundene wie ungebundene Fraktionen wurden wie in 3.3.1. beschrieben ausgetestet. Die Säule wurde mit 1M Natriumacetat pH3.0 regeneriert und wieder in Puffer pH4.0 oder in 8M Harnstoff/20mM Phosphatpuffer pH5.7 equilibriert.

3.3.4. Kationenaustausch-Chromatographie mit S-Sepharose fast flow

pINDUAH375 wurde über S-Sepharose fast flow bei pH7.5 getrennt. Die Säule hatte ein Gelvolumen von 20ml und wurde nach Regeneration mit Hochsalzpuffer im Ausgangspuffer A equilibriert. Die Probe lag in demselben Puffer vor. Puffer A bestand aus 4M Harnstoff/30mM Tris pH7.5/PMSF, Puffer B aus 4M Harnstoff/30mM Tris pH7.5/1M NaCl/PMSF. Es wurde ein linearer Salzgradient von 0-1M NaCl angelegt. Die gebundenen und ungebundenen Fraktionen wurden im 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt, und das Gel mit Silbernitrat angefärbt.

3.3.5. Kationenaustausch-Chromatographie (HPLC)

Die Auftrennung von pUC18B640/620 erfolgte über eine Mono S HR5/5-Säule (Pharmacia), die als funktionelle Gruppe eine Sulphomethyl-Gruppe enthält. Als Ausgangspuffer (A) wurde 50mM Phosphatpuffer pH6.8/0.5% SDS/PMSF verwendet. Der Hochsalzpuffer bestand aus Puffer A mit 1M NaCl. Es wurde nach folgendem Gradienten getrennt:

0-15min.	100% A	0% B
15-45min.	100-0% A	0-100% B
45-50min.	0-100% A	100-0% B

Der Gradientenverlauf wurde über einen pH-/Ionenmonitor überprüft. Das Auftragsvolumen betrug 2ml, die Flußrate 1ml/min. Die Fraktionen wurden im Durchfluß-Photometer bei $\lambda=276\text{nm}$ vermessen und das dazugehörige Spektrum aufgenommen. Die Fraktionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot charakterisiert.

3.4. Hydrophobe Chromatographie

Der Bakterienextrakt aus pUR290CXH580 bzw. pUC9MBcE3.2 wurde nach der 25%igen Ammoniumsulfatfällung über eine Phenyl-Sepharose CL-4B Säule (Pharmacia) geschickt. Die Reaktion beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Phenylgruppen und hydrophoben Proteinen. Nach Auftragen der Probe wurde die Säule mit dest. Wasser gewaschen und anschließend ein Gradient bis 50% Ethylenglykol angelegt. Damit wird die Polarität erniedrigt, und die gebundenen Proteine werden eluiert. Die Säule wurde durch Waschen mit Ethanol und Wasser wieder regeneriert. Das Eluat wurde fraktioniert gesammelt und die einzelnen Fraktionen über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot identifiziert.

3.5. Reversed Phase-Chromatographie (HPLC)

Die Proben (pUC18B640/620) wurden über Lichrosorb RP2 (Merck) getrennt. Die Säule bindet hydrophobe Substanzen, die durch einen Anstieg von unpolarem Lösungsmittel wieder von der Säule eluiert werden können. Lichrosorb RP2 besitzt als funktionelle Gruppen Dimethyldichlorsilan. Der Ausgangspuffer (A) war bidest. Wasser/0.1% Trifluoressigsäure. Die Probe wurde in 2M Harnstoff/10mM Tris pH7.5/0.5% SDS gelöst. Der lineare Gradient verlief bis 65% Acetonitril/35% bidest. Wasser /0.1% Trifluoressigsäure (= 100% B). Der genaue Gradientenverlauf war folgender:

0-10min.	100% A	0% B
10-40min.	100-0% A	0-100% B
40-50min.	0% A	100% B
50-55min.	0-100% A	100-0% B

Das Auftragsvolumen betrug 2ml, die Flußrate 1.2ml/min. Die Fraktionen wurden im Durchfluß-Photometer bei $\lambda=226\text{nm}$ gemessen und das Spektrum aufgenommen. Die Fraktionen wurden im 12.5%igen SDS-PAGE mit Coomassie blue-Färbung bzw. mit Western Blot identifiziert.

3.6. Affinitätschromatographie

Cyanbromid-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia) wurde nach Anleitung des Herstellers aufbereitet, mit monoklonalen Antikörpern (aus Mausascites) gegen p138 mit 0.1M Carbonatpuffer pH8.3 gekoppelt und die noch verbliebenen aktiven Gruppen mit 1M Ethanolamin abgeblockt. Das Bakterienlysate aus pUCARG1140 wurde über PD10-Säulen (Pharmacia) in 0.1M Natriumhydrogencarbonatpuffer pH8.3 mit 0.5M NaCl umgepuffert. Die Probe wurde auf die Säule mit einem Volumen von 1.5ml aufgetragen. Nach 30min. Einwirkzeit wurde die Säule mit verschiedenen Puffern gespült: 0.1M Glycin/0.2M HCl pH2.5, 1M Essigsäure, 0.15M NaCl/Ammoniak pH11, 8M Harnstoff/20mM Tris-HCl pH7.0, 50% Ethylenglykol. Die eluierten Proteine wurden fraktioniert und wie bereits beschrieben ausgewertet.

4. Elektroelutionsverfahren

Die über Säulenchromatographie vorgereinigten Proteine wurden teilweise in einem präparativen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde wie die analytischen Gele gegossen, nur wurde in das Sammelgel kein Kamm eingesetzt, so daß sich die Probe (Volumen 1ml) gleichmäßig über das gesamte Sammelgel verteilen konnte. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde ein Streifen des Gels abgeschnitten und Coomassie blue gefärbt. Das restliche Gel wurde in der Zwischenzeit mit Cellophan abgedeckt und bei -20°C eingefroren. Nach der Färbung des Streifens wurde dieser abgemessen und der Abstand Lauffront/gesuchtes Protein prozentual berechnet. Im eingefrorenen, ungefärbten Gel wurde der Berechnung entsprechend die Bande ausgeschnitten. Das restliche Gel wurde zur Kontrolle ebenfalls Coomassie blue gefärbt. Das Protein in dem ausgeschnittenen Gel wurde mit Hilfe einer Biotrap-Apparatur (Schleicher & Schuell) nach Anleitung des Herstellers eluiert. Die Biotrap (160x30x30mm) wird mit zweierlei Membranen beschickt. Die äußeren Membranen (BT1) halten Makromoleküle zurück und lassen Pufferionen ungehindert passieren. Die innere Membran (BT2), die in Richtung Anode eingesetzt wird, läßt sowohl Makromoleküle als auch Pufferionen durch. In dieser "Anodenfalle" werden alle negativ geladenen Proteine konzentriert. Die BT2-Membran verhindert beim Entleeren der Anodenkammer das sofortige Nachströmen des Puffers. Der Abstand zwischen innerer und äußerer Membran ist variabel, so daß man Proteinkonzentrate mit einem Volumen von 200 bis 800µl erhalten kann. Die Biotrap-Kammer wurde in eine Elektrophoresekammer gestellt und mit Elektrophoresepuffer (25mM Tris-Base, 192mM Glycin und 0.1% SDS, pH8.5) beschickt. Der Pufferspiegel (2/3 der Elutionskammer) war dabei sowohl in der Elutionskammer wie in der Anodenfalle und in der Elektrophoresekammer gleich hoch. Der Gelstreifen wurde in die Elutionskammer gelegt, und es wurde eine Spannung von 200V eingestellt. Nach 2h wurde die Spannung für 20 Sekunden umgepolt, um die Makromoleküle von der BT1-Membran zu entfernen, und die Proteinlösung wurde aus der Anodenfalle mit einer

Pasteurpipette entnommen. 1 μ l dieses Eluats wurde nochmals auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel überprüft.

5. Zellkultur

Die Suspensionszelllinien (BJA-B, Raji, B95-8, P3HR1) wurden alle in RPMI 1640 (Gibco) mit 10% FKS (Inaktivierung 30min./56°C) unter einem Zusatz von 200IE/ml Penicillin, 200 μ g/ml Streptomycin und 7.5 μ g/ml Glutamin hochgezogen. Die Zellen wurden individuell nach ihrem Wachstum alle 3 -5 Tage im Verhältnis 1:2 gesplittet.

6. Induktion

Um bei Raji- und P3HR1-Zellen die Produktion viraler Proteine zu erhöhen, wurden diese mit 40ng/ml Phorbolster (PE) und 3mM Buttersäure (BS) induziert. Die Dauer der Induktion betrug bei anschließender in vivo Markierung 24h, bei einer Viruspräparation (unmarkierter Proteinextrakt) 5 Tage.

7. Virusreinigung und Superinfektion

Zur Superinfektion von Raji-Zellen wurde Virus aus P3HR1-Zellen benutzt. Dazu wurden die P3HR1-Zellen wie oben beschrieben (6.) für 5 Tage bei 32°C induziert, anschließend für 30min. bei 4000upm und Raumtemperatur in einem A6.9 Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals für 2h bei 12000upm und 4°C in einem A6.14 Rotor abzentrifugiert. Das Viruspellet wurde in etwas Medium resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Um die Viruskonzentration bestimmen zu können, wurden geometrische Verdünnungsreihen hergestellt und in einer Superinfektion getestet.

Für die Superinfektion wurde die Zellkultur 8h vor Zugabe des Virus gesplittet. 10^6 Zellen wurden für 10min. bei 800upm und 4°C abzentrifugiert, die vorher ausgetestete Virusmenge dazugegeben und für 1h

bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden 2ml RPMI 1640 mit 2% FKS dazugegeben, und die Zellen für 12h bei 37°C in einem CO₂-Schränk inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in Methionin-freiem MEM (Minimal Essential Medium, Gibco) mit 2% FKS und 50µCi/ml ³⁵S-Methionin (>800Ci/mM, Amersham, NEN) aufgenommen und für 4h bei 37°C markiert. Dann wurden die Zellen abermals in PBS gewaschen und in Immunpräzipitationspuffer (s. unten) lysiert.

8. In vivo Markierung von Proteinen

Für die in vivo Markierung von Proteinen mit ³⁵S-Methionin wurden jeweils 1x10⁶ Zellen abzentrifugiert (800upm/10min.), mit PBS gewaschen und im Markierungsmedium (s. 7) aufgenommen. Bei induzierten Zellen wurde dem Medium noch Phorbolster und Buttersäure in der entsprechenden Konzentration zugefügt. Die Zellen wurden entweder für 4h oder über Nacht bei 37°C in einem CO₂-Schränk inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Immunpräzipitationspuffer lysiert.

9. In vitro Translation

Für die in vitro Translation stellte R. Seibl (Seibl, 1985) die RNA und das Kaninchen-Retikulozytenlysat zur Verfügung. Für den Translationsansatz wurde außerdem ein Aminosäure-Pool (2.5mM/Aminosäure) hergestellt, bei dem das Methionin fehlte, da es als radioaktive Aminosäure (³⁵S-Methionin) eingesetzt wurde. Cystein wurde dem Master-Mix zugegeben, um es durch das darin enthaltene DTT im reduzierten Zustand zu halten.

Master-Mix:	Hepes pH 7.5	800mM
	Kreatinphosphat	400mM
	ATP	40mM
	GTP	2mM
	DTT	40mM
	Spermidin	20mM
	Cystein	2mM

Die EBV-RNA wurde vor Beginn der in vitro Translation für 1.5 min. auf 70°C erhitzt und dann im Eis abgekühlt. Damit wurden Sekundärstrukturen gelöst, welche die Synthese langer Polypeptide behindern würden. Die Konzentrationen für den Translationsansatz wurden aus der Dissertation von R. Seibl übernommen:

Retikulozytenlysats	60%
Aminosäure-Pool	2%
Master-Mix	2.5%
EBV-RNA	300µg/ml
Kaliumzugabe als K-Acetat	64mM
Magnesiumzugabe als Mg-Acetat	0.8mM
³⁵ S-Methionin	1-1.5mCi/ml
Kalbsleber-tRNA	2-3µg

Der Ansatz wurde 2h bei 30°C inkubiert und dann mit Lysispuffer (s. 10. Immunpräzipitation) gestoppt. Die Proben wurden dann für 5min. bei 100°C gekocht und in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt (s. 11. SDS-PAGE).

10. Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden die markierten und lysierten Zellextrakte verwendet. Als Immunpräzipitationspuffer diente dabei bei Patientenseren der A_{SDS}-Puffer mit folgender Zusammensetzung (Bayliss et al., 1983): 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 137mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 10% Glycerin, 20mM Tris-HCl pH9.0, 1mM PMSF.

Bei monoklonalen Antikörpern wurde der Puffer von G. Pearson (Pearson et al., 1983), der kein SDS, aber dafür eine höhere NaCl-Konzentration

enthält, benutzt: 0.5% NP-40, 300mM NaCl, 1mM CaCl_2 , 0.5mM MgCl_2 , 10% Glycerin, 20mM Tris-HCl pH9.0, 2mM EDTA, 1mM PMSF.

Für eine Immunpräzipitation wurde der markierte Proteinextrakt aus 10^6 Zellen mit 10 μ l Patientenserum versetzt und 2-6h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 3mg in Puffer gequollene Protein A Sepharose CL4B Beads (Pharmacia) pro Ansatz zugegeben. Das Ganze wurde 2h bei Raumtemperatur geschüttelt, um die Immunglobuline, überwiegend IgG, an Protein A zu koppeln. Anschließend wurden die Beads kurz abzentrifugiert, zweimal mit Präzipitationspuffer und zweimal mit dest. Wasser gewaschen. Die Beads wurden dann in 100 μ l Lysispuffer (3% Saccharose, 2% SDS, 5% β -Merkaptoethanol, 20mM Tris-HCl pH7.0, Bromphenolblau) aufgenommen, für 5min. auf 100°C erhitzt, und der Überstand für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt.

Um Störungen von zellulären Proteinen auszuschalten, wurden die Patientenseren vor Gebrauch mit einem Extrakt aus EBV-negativen BJA-B-Zellen über Nacht bei 4°C abgesättigt. Dazu wurde pro 10 μ l Serum ein Extrakt aus 10^7 Zellen verwendet.

11. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Es wurde das Verfahren nach Laemmli (Laemmli, 1970) angewandt, das die Proteine in einem diskontinuierlichen Puffersystem auftrennt. Dabei wurde mit einem stark vernetzten Trenngel und mit einem schwach vernetzten Sammelgel gearbeitet. Der pH-Wert der beiden Gele ist unterschiedlich, im Sammelgel liegt er bei 7.0, im Trenngel bei 8.5. Die scharfe Trennung dieses Systems liegt an der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der Leitonen und Folgeionen bei pH7.0 und pH8.5. Die aufzutrennenden Proteine haben im Sammelgel eine Wanderungsgeschwindigkeit, die zwischen der von den Leit- und Folgeionen des Puffers liegt, d.h. die Proteine werden konzentriert. Im Trenngel dagegen wandern die Proteine langsamer als die niedermolekularen Pufferionen, was zu einer Auftrennung der Proteine führt (Maurer, 1971).

Die Zusammensetzung der Trenngele war folgendermaßen: 10-20% Acrylamid (Bio-Rad, Konzentration abhängig vom Molekulargewicht der Proteine), 0.026% Diallyltartardiamid (DATD, Bio-Rad) pro Prozent Acrylamid, 0.15% SDS, 375mM Tris-HCl pH8.5, 0.14mM Ammoniumperoxodisulphat (AMPER, Bio-Rad) und 0.035% N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED, Bio-Rad). AMPER und TEMED dienten dabei als Radikalstarter für die Polymerisation. 2-4h nach Polymerisation wurde das Sammelgel (3.1% Acrylamid, 0.08% Diallyltartardiamid, 0.1% SDS, 125mM Tris-HCl pH7.0, 3mM AMPER und 0.05% TEMED) über das Trenngel gegossen und mit einem Teflonkamm versehen. Die Anoden- und Kathodenkammer wurde mit identischer Pufferlösung gefüllt: 25mM Tris-Base, 192mM Glycin und 0.1% SDS, pH8.5. Es wurden jeweils 40µl bzw. 8µl bei Minigelen Probe in Lysispuffer (s. 10.) pro Tasche aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur über Nacht mit konstanter Stromstärke von 6mA/cm² durchgeführt, wenn es sich um die Gelgröße 20x15cm handelte, und bei Raumtemperatur für 2h mit konstanter Stromstärke von 27mA/cm² bei den Minigelen (7.5x7.5cm). Anschließend wurden die Gele entweder mit Coomassie Brilliant Blue oder mit Silber gefärbt oder die Gele wurden ungefärbt sofort nach der Elektrophorese auf Nitrocellulose (NC) transferriert.

Als Molekulargewichtsmarker diente eine Mischung aus Myosin (200kD), β -Galaktosidase (116kD), β -Phosphorylase (96kD), Rinderserumalbumin (68kD), Ovalbumin (45kD) und Carboanhydrase (30kD) der Firma Sigma.

12. Färben der Proteine

12.1. Coomassie Brilliant Blue Färbung

Nach der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden die Gele in einer Mischung aus 0.075% Coomassie Brilliant Blau (Bio-Rad), 25% Isopropanol und 10% Eisessig fixiert und gefärbt. Anschließend wurden die Gele in 15% Isopropanol mit 10% Eisessig entfärbt, bis der Hintergrund klar war.

Die Gele wurden bei 60°C auf Whatman 3MM Filterpapier unter Vakuum getrocknet und, wenn es sich um radioaktiv markierte Gele gehandelt hat, bei Raumtemperatur mit ^3H Ultro-Film (LKB) oder β -Max (Amersham) exponiert.

12.2. Silberfärbung

Es wurde die ammoniakalische Silberfärbung durchgeführt. Nach dem Färben mit Coomassie Brilliant Blue und dem Entfärben (s. 12.1.) wurden die Gele in 10% Glutardialdehyd für 30min. geschwenkt, um das SDS zu entfernen. Für alle Schritte in der Silberfärbung wurde bidest. Wasser und Handschuhe benutzt. Nach gründlichem Waschen mit Wasser wurden die Gele für 15min. bei Raumtemperatur mit 0.02M NaOH, 0.35% Ammoniak und 0.8% Silbernitrat gefärbt, anschließend wieder gründlich gewaschen und mit 0.1mM Zitronensäure und 0.02% Formaldehyd entwickelt. Die Entwicklung wurde dann mit einem Fixierer aus 0.8% Natriumthiosulfat-Pentahydrat gestoppt. Die Gele wurden nochmals mit Wasser gewaschen und wie unter 12.1. beschrieben getrocknet.

13. Western Blot

Unter "Western Blot" oder "Immunoblot" versteht man die Übertragung der in Gelen aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose (Schleicher & Schuell, BA85) mittels elektrischen Stroms. Das Verfahren für die Markierung mit Peroxidase gekoppelten Antikörpern wurde im Bezug auf die Waschpuffer modifiziert (Wilske et al., 1986).

Für den Proteintransfer befand sich das Gel mit der anliegenden Nitrocellulose zwischen Whatman 3MM Filterpapier, leitfähigem, 1cm dicken Schaumstoff und zwei Kohleplatten, die über Platinelektroden den Strom leiten. Filterpapier, Schaumstoff und Nitrocellulose wurden gut mit Blot-Puffer (192mM Glycin, 25mM Tris-Base, 20% Methanol, pH8.5) getränkt. Der Transfer fand bei den 20x15cm Gelen bei $2\text{mA}/\text{cm}^2$ für 2h und bei den 7.5x7.5cm Gelen bei $9\text{mA}/\text{cm}^2$ für 30min. statt. Freie

Bindungsstellen auf der Nitrocellulose wurden dann für 1h bei 37°C mit Cohen-Puffer (1mg/ml Ficoll 400, 1mg/ml Polyvinylpyrrolidon, 16mg/ml Rinderserumalbumin, 0.1% NP 40, 0.05% Bacto-Gelatine in Natriumboratpuffer pH8.2; Cohen et al., 1984) abgesättigt. Der Blot wurde über Nacht bei Raumtemperatur mit Serum (Verdünnung 1:50 in 154mM NaCl und 10mM Tris-HCl pH7.5) oder monoklonalen Antikörpern (Verdünnung 1:1000) unter Schütteln inkubiert.

13.1. Markierung mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern

Nach der Seruminkubation wurde der Blot unter 4-6 maligem Wechsel mit Gelatinepuffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 0.25% Gelatine, 0.5% Triton X-100, 0.1% SDS) gewaschen. Anschließend wurde der Blot mit Peroxidase-gekoppeltem anti-human-Immunglobulin bzw. anti-Maus-Immunglobulin (Verdünnung 1:1000 in 154mM NaCl und 10mM Tris-HCl pH7.5, Medac und Dakopatts) für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Gelatinepuffer wurde der Blot mit 0.5mg/ml Diaminobenzidin und 0.01% Wasserstoffperoxid in 50mM Tris-HCl pH7.5 gefärbt. Die Färbung wurde anschließend mit 1N Schwefelsäure gestoppt, der Blot mit Wasser säurefrei gewaschen und zwischen Filterpapier getrocknet.

13.2. Markierung mit Phosphatase-gekoppelten Antikörpern

Nach der Seruminkubation wurde der Blot mehrmals mit TTBS-Puffer (20mM Tris-HCl pH7.5, 0.5M NaCl, 0.05% Tween 20) gewaschen und für 2h bei Raumtemperatur mit Phosphatase-gekoppeltem anti-human Immunglobulin (Verdünnung 1:3000 in TTBS mit 1% Gelatine, Medac) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TTBS und einmaligem Spülen mit 20mM Tris-HCl pH7.5/0.5M NaCl wurde der Blot mit folgender Lösung gefärbt: 0.03% 4-Nitroblau-tetrazoliumchlorid (30mg NBT in 1ml 70% Dimethylformamid gelöst), 0.015% 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (15mg BCIP in 1ml 100% Dimethylformamid gelöst) in 0.1M

Natriumhydrogencarbonat mit 1mM MgCl_2 pH9.8. Der Blot wurde nach dem Anfärben (violette Banden) mit Wasser gespült und getrocknet.

13.3. Doppelmarkierung mit Peroxidase- und Phosphatase-gekoppelten Antikörpern

Um auf ein und demselben Blot die von zwei verschiedenen Seren (Serum 1 und 2) erkannten Proteine sichtbar machen zu können, wurde eine Doppelfärbung durchgeführt. Vorteil dieser Methode ist, daß die Proteinbanden, die sehr nahe beieinander liegen, sicher identifiziert werden können. Außerdem ist diese Methode material-, zeit- und kostensparend. Der Blot wurde hierbei zuerst mit Serum 1 (z.B. ein EBV-negatives Serum) nach Methode 13.1. inkubiert, gefärbt und entwickelt (braune Banden). Anschließend wurde der Blot nicht mit Schwefelsäure gestoppt, sondern gleich gründlich mit TTBS gewaschen und mit Serum 2 (z.B. ein EBV-positives Serum) nach Methode 13.2. behandelt (violette Banden).

14. Isoelektrische Fokussierung

Die Methode wurde weitestgehend von Mishell/Shiigi (1980) übernommen. Die Isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde in Röhrchengelen durchgeführt. Dazu wurden 100µl Mikropipetten mit IEF-Gellösung (8M Harnstoff, 4% Acrylamid, 4% Bisacrylamid, 2% NP-40, 1.2% Ampholine pH5-8 (Pharmacia), 0.8% Ampholine pH3.5-9.5 (LKB), 0.01% AMPER, 0.07% TEMED) beschickt. Nach der Polymerisation wurden die Gele mit 8M Harnstoff und Wasser für 1-2h überschichtet. Der Überstand wurde entfernt und durch IEF-Probenpuffer (8M Harnstoff, 2% NP-40, 1.2% Ampholine pH5-8, 0.8% Ampholine pH3.5-9.5, 5% β -Merkaptoethanol) für weitere 1-2h ersetzt. Nach Einsetzen der Gelröhrchen in die Fokussierungsapparatur wurde der Überstand abermals entfernt und durch neuen IEF-Probenpuffer ersetzt. Der Kationenpuffertank wurde mit 0.02M Natronlauge, der Anodenpuffertank mit 0.01M Phosphorsäure beschickt. Die

Gele wurden 15min. bei 200V, 30min. bei 300V und abermals 30min. bei 400V vorfokussiert. Anschließend wurde der Kationenpuffer und der Probenpuffer entfernt, und die Gele mit 30 μ l Proteinextrakt in Probenpuffer beschickt. Das Ganze wurde mit 8M Harnstoff, 0.8% Ampholine pH5-8 und 0.2% Ampholine pH3.5-9.5 überschichtet und 16h bei 400V und Raumtemperatur fokussiert. Um die Bandenschärfe zu steigern, wurde vor Beendigung der Fokussierung die Spannung für eine Stunde auf 800V erhöht. Die Gele wurden mittels einer Spritze aus den Glasröhrchen gepreßt und entweder mit 0.7M Trichloressigsäure/0.14M 5-Sulfosalicylsäure-dihydrat fixiert und anschließend Coomassie Blue gefärbt oder mit Hilfe einer Flachbettelektrode der pH-Wert an verschiedenen Stellen des Gels gemessen oder für eine weitere Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel im Equilibrierungspuffer (10% Glycerol, 5% β -Merkaptoethanol, 2.3% SDS, 0.0625M Tris-HCl pH6.8) equilibriert.

15. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese besteht aus einer Kombination von Isoelektrischer Fokussierung und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. In der ersten Dimension wurden die Proben wie unter 14. beschrieben nach ihren isoelektrischen Punkten aufgetrennt. Die Röhrchengele wurden anschließend equilibriert und quer auf dem Sammelgel eines SDS-Polyacrylamid-Gels mit 1% Agarose in Equilibrierungspuffer fixiert. Um die einzelnen Spots besser zuordnen zu können, wurde das Sammelgel noch mit zwei Taschen versehen, in welche einmal der Molekulargewichtsmarker und einmal die Probe ohne vorherige Fokussierung eingefüllt wurde. Die Elektrophorese wurde dann analog Punkt 11 durchgeführt.

16. Bestimmung der Proteinkonzentration

16.1. Proteinbestimmung nach Lowry

Zu 1 Teil Probe (ev. in verschiedenen Verdünnungen) wurden 5 Teile einer Lösung aus 0.01% Kupfersulfat, 0.02% Natriumtartrat und 2% Natriumcarbonat in 0.1M Natronlauge gegeben. Nach dem Mischen wurde bei Raumtemperatur für 10min. inkubiert, 0.5 Teile 1N Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Merck) dazugemischt und bei Raumtemperatur für 30min. inkubiert. Die Bestimmung der Farbintensität erfolgte durch die Messung der optischen Dichte bei $\lambda=750\text{nm}$. Um die absolute Menge bestimmen zu können, wurde eine Standardkurve erstellt. Ausgangspunkt war eine Gesamt-Eiweiß-Lösung (Boehringer, Mannheim) mit einer Konzentration von $6\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die Eichgerade enthielt Werte von $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bis $0.2\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

16.2. Proteinbestimmung über die Optische Dichte

Für die annähernde Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde der jeweilige Proteinextrakt im Photometer bei $\lambda=280\text{nm}$ gemessen. Der OD-Wert wurde dann mg/ml gesetzt, d.h. eine OD von 1.0 entspricht $1\text{mg}/\text{ml}$.

17. Auswertung über Densitometer

Für die Auswertung der Polyacrylamidgele und der Western Blots wurde ein Densitometer (Hirschmann) benutzt. Es wurde die Remission der einzelnen Banden bei $\lambda=366\text{nm}$ gemessen und aufgezeichnet. Um die verschiedenen Densitogramme vergleichen zu können, wurde die höchste Extinktion gleich 100% Schreiberausschlag gesetzt. War durch die Coomassie blue-Färbung oder die Immunoblotfärbung der Hintergrund unterschiedlich stark gefärbt, so konnte es zum Anstieg der Basislinie kommen. Um dies zu korrigieren, wurden die einzelnen Peaks im Densitogramm über eine automatische Minimumberechnung markiert und zwischen diesen Markierungen eine neue Basislinie gezogen. Die prozentuale Berechnung der einzelnen Peaks erfolgte

ebenfalls automatisch über das Minimumprogramm. Die einzelnen Flächenintegrale waren als Inkremente angegeben, die Gesamtfläche wurde als 100% angesetzt.

18. ELISA

Als Mikrotiterplatten wurden 96-Lochplatten (Dynatech) mit Flachboden benutzt. Die gereinigten Antigene (s. 3. und 4.) wurden in einer Konzentration von 0.01-0.03 µg/Loch zum ELISA-Test verwendet. Die optimale Antigenkonzentration wurde durch Verdünnungsreihen bestimmt. Als Verdünnungspuffer diente ein 0.1M Carbonatpuffer pH9.5 mit 150mM NaCl. Die Antigene wurden über Nacht bei 37°C an die Platte gebunden. Anschließend wurden die Platten mit PBS/0.5% Tween 20 dreimal gewaschen, und die noch freien Bindungsstellen mit PBS/0.5% Gelatine/2% Kaninchenserum für 1h bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach weiterem dreimaligen Waschen wurden jeweils 50 µl verschiedener Seren in einer Verdünnung von 1:50 oder 1:100 in PBS/2% Kaninchenserum für 2h bei 37°C dazupipettiert. Die Seren wurden durch dreimaliges Waschen entfernt, und die Platten mit 50 µl Peroxidase-gekoppeltem anti-human IgG (bzw. IgA oder IgM) in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS/0.5% Tween 20/2% Kaninchenserum für 2h bei 37°C inkubiert. Der zweite Antikörper wurde dreimal mit PBS/0.5% Tween 20 und anschließend einmal mit PBS von der Platte gewaschen. Die Färbung wurde dann mit 0.1% o-Phenylendiamin in 0.1M Phosphatpuffer pH6.0 unter Zusatz von 0.03% Wasserstoffperoxid durchgeführt. Als Stoppuffer diente eine 1N Schwefelsäure. Die Platten wurden in einem ELISA-Meßgerät (Kontron) bei $\lambda=486\text{nm}$ ausgewertet. Um die Richtigkeit der Reaktion zu prüfen, wurden bei jedem Test PBS-Kontrollen sowie EBV-negative und EBV-positive Standardseren mitgeführt. Die Mittelwerte der einzelnen Serengruppen wurden gebildet, der Mittelwert der negativen Seren $F=1$ gesetzt und die anderen Mittelwerte darauf bezogen. In die Darstellung als Balkendiagramm wurde dann noch die Standardabweichung eingezeichnet. Berechnet wurde sie als:

$$sd = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{\sqrt{n - 1}}$$

E. Ergebnisse

1. Auswahl diagnostisch relevanter Proteine

Die Diagnose des Epstein-Barr Virus wird in der Routinediagnostik meist mit Hilfe der Immunfluoreszenz durchgeführt. Hierbei wird nur nach Antigenklassen (VCA, EA, EBNA) unterschieden, nicht jedoch nach einzelnen Antigenen. Um mögliche Kreuzreaktionen zwischen EBV und anderen Erregern, wie z.B. CMV zu prüfen, wurden Seren von Patienten, die eine frische EBV-Infektion durchliefen, und Seren von Personen, die eine abgelaufene EBV-Erkrankung aufwiesen, mit Seren von Patienten, die eine akute CMV-Infektion aufwiesen, verglichen. Es wurden dabei in der Immunpräzipitation Antikörper der Immunglobulinklasse M und G nachgewiesen.

Serum	anti-VCA-IgM	anti-VCA-IgG	anti-EA	anti-EBNA	anti-CMV-IgM	anti-CMV-IgG
1	neg.	1:256	1:64	pos.	neg.	n.t.
2	1:80	1:640	1:128	neg.	unspez.	neg.
3	n.t.	1:320	1:40	neg.	schw. pos.	neg.
4	1:256	1:320	1:128	neg.	pos.	unspez.
5	1:60	1:160	1:40	schw. pos.	neg.	neg.
6	1:8	1:160	1:80	pos.	neg.	neg.
7	1:8	1:80	neg.	pos.	pos.	pos.
8	1:128	1:80	neg.	pos.	pos.	pos.
9	1:60	1:320	neg.	pos.	pos.	pos.
10	1:120	1:320	neg.	pos.	schw. pos.	pos.

Tab. 1 Zusammenfassung der EBV-Titer und CMV-Ergebnisse. Immunfluoreszenztests durchgeführt in der Routinediagnostik des Max von Pettenkofer Instituts, München, und bei T. Krech im Institut für med. Mikrobiologie und Virologie, Düsseldorf. Die Serennummern entsprechen denen der Abb. 4 und 5; Serum 1: NPC-Pool/CMV neg.; Serum 2-4: frische EBV-Infektion/frische CMV-Infektion; Serum 5-6: abgelaufene EBV-Infektion/CMV neg.; Serum 7-10: abgelaufene EBV-Infektion/frische CMV-Infektion

Die Antikörper wurden zuerst über Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) nach Klassen (IgM/IgG) getrennt, fraktioniert gesammelt und anschließend an trägergebundenes anti- μ (zur Bindung der IgM-Antikörper) bzw. an Protein A-Sepharose aus Staph. aureus (zur Bindung der IgG-Antikörper) als zweiter Trennschritt gebunden. Die Immunpräzipitation mit superinfizierten Raji-Zellen zeigte bei allen Seren außer bei Serum 2, das bereits einen Tag nach Erkrankung abgenommen worden war, eine Reaktion von Antikörpern gegen das EBV-Viruskapsidantigen p150. Antikörper der IgM-Klasse gegen das frühe Antigen p54 schienen etwas EBV-spezifischer zu sein, da Seren, die in der Immunfluoreszenz gegen EA negativ waren und die gleichzeitig IgM-Antikörper gegen CMV enthielten, nicht mit dem p54 EA reagierten. Sie reagierten jedoch teilweise mit dem frühen Antigen p138 (Serum 9 und 10). Antikörper der IgG-Klasse gegen die Proteine p90 und p54 waren strikt EBV spezifisch. Sie zeigten sich nie bei EBV-EA negativen und CMV positiven Seren (Abb. 4 und 5).

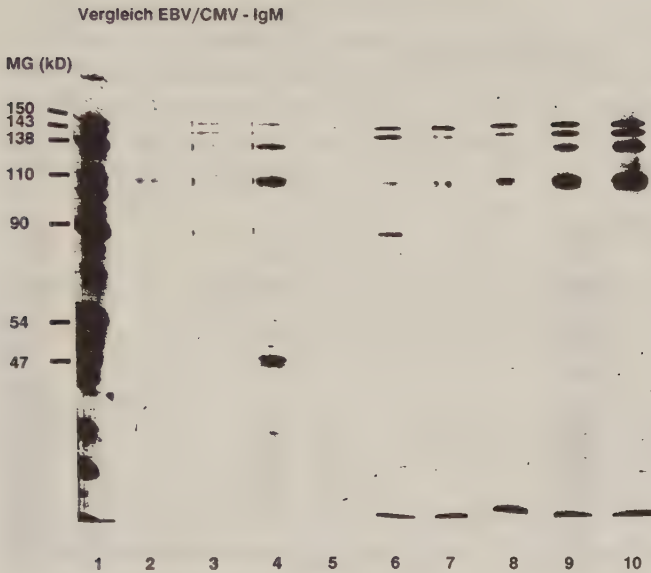


Abb. 4 Autoradiogramm einer Immunpräzipitation mit menschlichen Seren, die IgM-Antikörper gegen EBV-Proteine enthalten. Spur 1: Kontrolle (NPC-Pool/CMV neg.), Spur 2-4: frische EBV-Infektion/frische CMV-Infektion; Spur 5-6: abgelaufene EBV-Infektion/CMV neg.; Spur 7-10: abgelaufene EBV-Infektion/frische CMV-Infektion

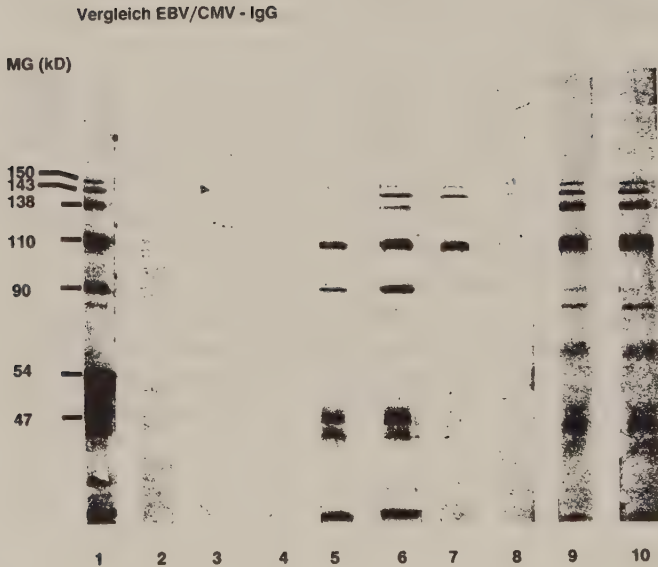


Abb. 5 Autoradiogramm einer Immunpräzipitation mit menschlichen Seren, die IgG-Antikörper gegen EBV-Proteine enthalten. Spur 1: Kontrolle (NPC-Pool/CMV neg.), Spur 2-4: frische EBV-Infektion/frische CMV-Infektion; Spur 5-6: abgelaufene EBV-Infektion/CMV neg.; Spur 7-10: abgelaufene EBV-Infektion/frische CMV-Infektion

Die Spezifität der Tests ist in der Diagnostik des Epstein-Barr Virus von entscheidender Bedeutung, da die Abgrenzung zu anderen Krankheiten gewährleistet sein muß, um eine bestmögliche Therapie anwenden zu können.

Der hohe diagnostische Wert eines maschinenlesbaren und damit objektivierbaren EBV-Tests und die eben gezeigten möglichen Kreuzreaktionen waren Anlaß, die EBV-Diagnostik neu zu gestalten. Die Idee war, über EBV-spezifische Virusantigene eine bessere Aussage über die verschiedenen Erkrankungen machen zu können. Da nicht alle ca. 40

Virusantigene für die Diagnostik wichtig sind, galt es, die relevanten Antigene zu definieren. Dazu wurde eine IgG-spezifische Immunpräzipitation von superinfiziertem Raji-Zellextrakt mit Seren von frisch EBV-Infizierten bzw. Seren von Patienten mit einem Nasopharynxkarzinom, sowie Seren von Personen mit einer abgelaufenen EBV-Infektion getestet (Abb. 6).

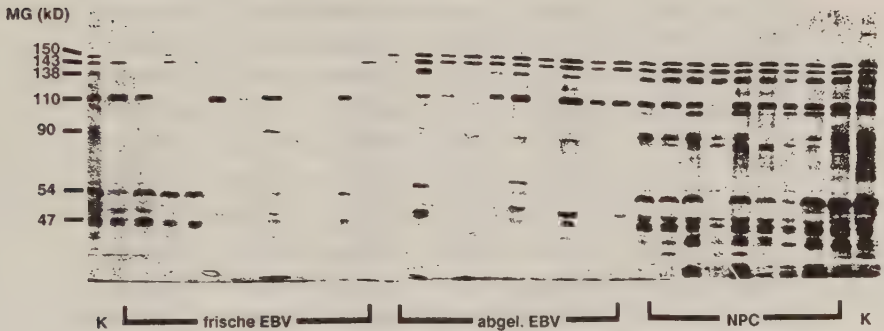


Abb. 6 Autoradiogramm einer Immunpräzipitation von Seren von Patienten mit einer frischen, einer abgelaufenen EBV-Infektion und von Patienten mit einem Nasopharynxkarzinom. Als Zellextrakt wurden ^{35}S -Methionin-markierte superinfizierte Raji-Zellen benutzt; K=pos. Kontrolle (NPC-Pool)

Diese Seren wurden auf Grund der Testergebnisse in der indirekten Immunfluoreszenz aus der Routinediagnostikabteilung ausgesucht (Tab. 2).

Serum	anti- VCAIgM	anti- VCAIgG	anti- VCAIgA	anti- EAIgG	anti- EAIgA	anti- EBNA
F 1	1:32	1:128	n.t.	1: 8	n.t.	negativ
F 2	1:32	1: 32	n.t.	1:32	n.t.	negativ
F 3	1:32	1: 32	n.t.	1:32	n.t.	negativ
F 4	1:32	1:128	n.t.	n.t.	n.t.	negativ
F 5	1:32	1:512	n.t.	negativ	n.t.	negativ
F 6	1:32	1:128	n.t.	n.t.	n.t.	positiv
F 7	1:32	1:128	n.t.	negativ	n.t.	negativ
F 8	1:16	1: 16	n.t.	negativ	n.t.	negativ
F 9	1:32	1:128	n.t.	negativ	n.t.	negativ
F10	1:32	1:1024	n.t.	1:16	n.t.	negativ
F11	1:32	1:128	n.t.	negativ	n.t.	negativ
A 1	n.t.	1: 32	n.t.	negativ	n.t.	positiv
A 2	n.t.	1: 32	n.t.	negativ	n.t.	positiv
A 3	negativ	1: 32	n.t.	negativ	n.t.	positiv
A 4	negativ	1: 32	n.t.	negativ	n.t.	positiv
A 5	negativ	1:128	n.t.	negativ	n.t.	positiv
A 6	n.t.	1:128	negativ	negativ	negativ	schw.positiv
A 7	negativ	1: 32	n.t.	negativ	n.t.	positiv
A 8	negativ	1:128	n.t.	1:16	n.t.	positiv
A 9	negativ	1: 32	n.t.	n.t.	n.t.	positiv
A10	negativ	1: 32	n.t.	n.t.	n.t.	schw.positiv
N 1	n.t.	1:256	1:256	1: 64	1: 64	positiv
N 2	n.t.	1: 32	1: 32	1: 8	1: 16	positiv
N 3	n.t.	1:2048	1:128	1: 32	1: 64	positiv
N 4	n.t.	1:1024	1: 64	1: 64	1: 8	positiv
N 5	n.t.	1:128	1: 32	1:1024	negativ	positiv
N 6	n.t.	1:512	1:128	1: 64	1: 16	positiv
N 7	n.t.	1:128	1:128	1:128	1:512	positiv
N 8	n.t.	1:2048	1:128	1:1024	1:256	positiv
N 9	n.t.	1:512	1: 64	1: 32	1: 16	positiv
K	n.t.	1:256	1: 64	1: 64	1:128	positiv

Tab. 2 Titrationsergebnisse von menschlichen Seren in der Immunfluoreszenz. Abkürzungen: F=frische Infektion, A=abgelaufene Infektion; N=Nasopharynxkarzinom; K=Kontrolle (NPC-Pool), n.t.=nicht getestet, schw.=schwach

Es zeigte sich, daß Antikörper gegen das p150 VCA bei NPC-Patienten und bei Personen mit einer abgelaufenen Infektion stets vorhanden waren. Bei einer frischen Infektion waren diese Antikörper seltener und in schwächerer Form vorhanden. Antikörper gegen p143 VCA ergaben dasselbe Profil wie die Antikörper gegen p150. Sie brachten daher keine zusätzliche Information für die Diagnostik. Antikörper gegen p138 EA waren stets bei NPC-Patienten und manchmal bei Personen mit einer abgelaufenen Infektion vorhanden. Sie zeigten sich jedoch in keinem der Seren von frisch Infizierten. Antikörper gegen p110 und p90 ließen keine Korrelation zu einem bestimmten Stadium der EBV-Infektion zu und waren daher für einen diagnostischen Test unbrauchbar. Antikörper gegen p54 waren ebenfalls immer bei NPC-Patienten vorhanden, seltener bei frisch Infizierten. Bei Personen mit einer abgelaufenen EBV-Infektion waren sie nur in Verbindung mit Antikörpern gegen das frühe Antigen p138 präzipitierbar. Antikörper gegen das Membranantigen gp350/250 konnten mit einer ³⁵S-Methionin markierten Immunpräzipitation nicht nachgewiesen werden, da wegen der geringen Halbwertszeit nur sehr wenig Membranantigene gp350/250 vorhanden sind, so daß die Markierung mit radioaktivem Methionin stark limitiert ist. Antikörper gegen gp350/250 schienen jedoch nach Untersuchungen von W. Jilg (Jilg und Wolf, 1985) relevant für eine chronische EBV-Infektion zu sein. IgG-Antikörper gegen gp350/250 sind bei einer chronischen Infektion nicht vorhanden. Im Western Blot konnten auch Antikörper der Klasse M und A sowie Antikörper gegen EBNA dargestellt werden. Antikörper gegen EBNA fehlten bei frischen Infektionen und waren bei abgelaufenen Erkrankungen und bei Seren von NPC-Patienten vorhanden. Dabei erscheint EBNA in superinfizierten Raji-Zellen immer als Doppelbande, da sowohl ein EBNA vom P3HR1-Virus als auch von den Raji-Zellen vorhanden ist.

Antikörper der IgM-Klasse gegen p150 und p54 bzw. seinem Vorläufer p47 fanden sich, wie der Western Blot zeigt, bei Patienten mit einer akuten EBV-Erkrankung. NPC-Patienten konnten im Serum IgM-Antikörper gegen p138 aufweisen, mußten sie jedoch nicht zwingend besitzen. Personen mit einer abgelaufenen Infektion besaßen erwartungsgemäß keine Antikörper der IgM-Klasse.

Antikörper der IgA-Klasse gegen die frühen Antigene p138 und p54 wiesen nur Patienten mit einem Nasopharynxkarzinom auf (Abb. 7).

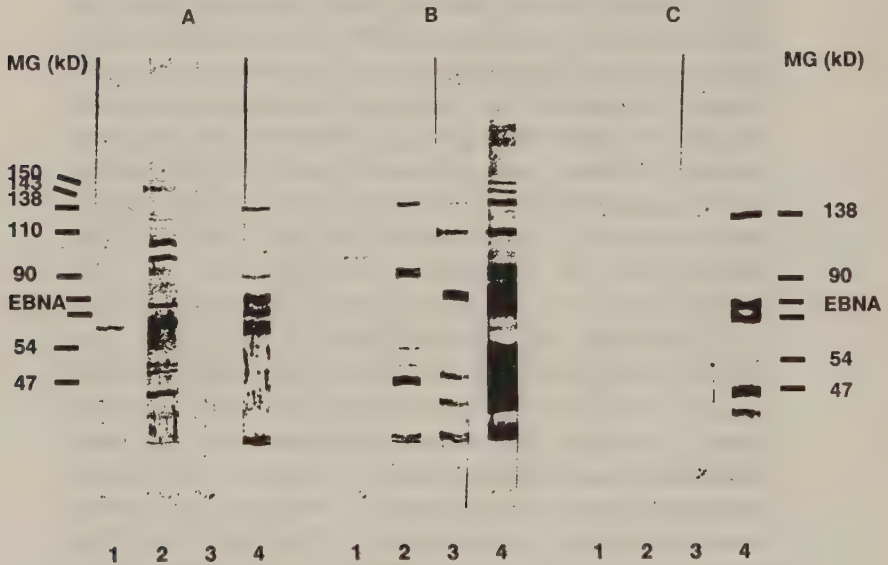


Abb. 7 Western Blot eines 10%igen SDS-PAGE mit superinfizierten Raji-Zellen als Antigen und Peroxidase-markiertem zweiten Antikörper der Klasse IgM (A), IgG (B) und IgA (C). Als erste Antikörper dienen in Spur 1: Serum ohne EBV-Antikörper; Spur 2: Serum eines frisch EBV-Infizierten; Spur 3: Serum eines Patienten mit einer abgelaufenen EBV-Infektion; Spur 4: Serum eines Patienten mit NPC.

Zusammenfassend konnten als diagnostisch relevante Antigene ausgewählt werden:

p150 VCA p138 EA p54 EA EBNA gp350/250 MA

2. Viruskapsidantigen p150

2.1. Lokalisation im EBV-Genom

Die Kartierung der EBV-Proteine durch R. Seibl (Seibl und Wolf, 1985) zeigte, daß das Leseraster für p150 VCA im BamHI-c Fragment startet und im BamHI-D Fragment endet. Der kodierende Bereich für das Protein ist 1382 Aminosäuren groß. Da das ganze Protein für eine stabile Expression in *E.coli* zu groß ist, wurde mit Hilfe von Computerprogrammen eine Darstellung der antigenen Bereiche versucht. Die Vorhersagen für die Antigenität basierten auf einer Kombination von Hydrophilizitätsberechnungen (Hopp und Woods, 1981) und Berechnungen der Sekundärstruktur (Chou und Fasman, 1974 a, b; Argos et al., 1978; Wolf et al., 1987). Als besonders antigene Bereiche werden die stark hydrophilen Regionen mit β -turns angesehen. Es ergaben sich acht Epitope, die antigene Eigenschaften aufweisen sollten, von denen fünf für weitere Klonierungen benutzt wurden (Abb. 8).

ebv150.pgp ck: 4675

Chou-Fasman prediction
28-APR-1987 18:29

○ Hydro-Philicity ≥ 0.7
◇ Hydro-Phobicity ≤ -0.7

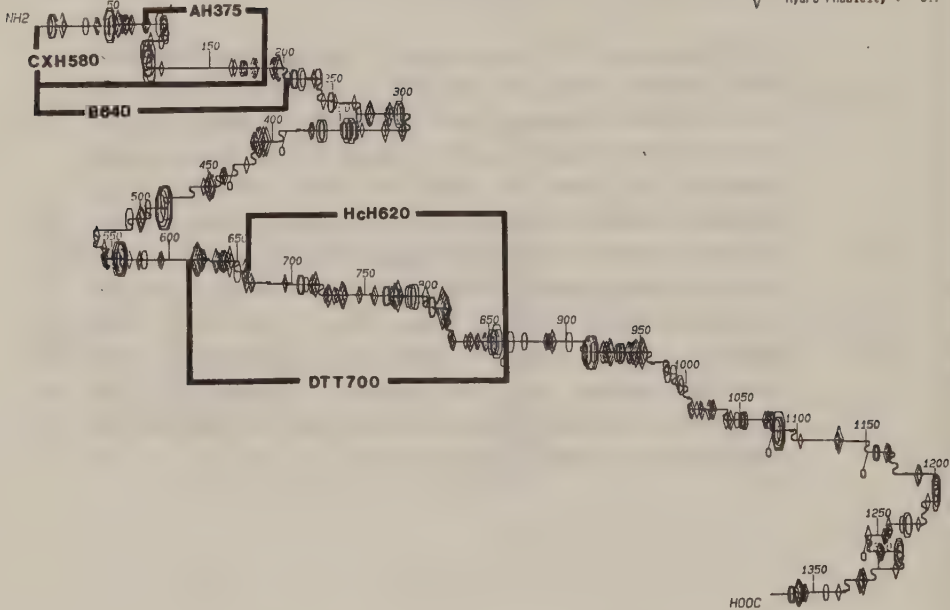


Abb. 8 Computer Plot der berechneten Sekundärstruktur von p150. Hydrophobe Bereiche sind als Rauten, hydrophile Bereiche als Kreise gezeichnet. β -turns sind als Drehungen um 180° zu erkennen, die glykosylierten Stellen sind mit O bezeichnet.

2.2. Expression eines β -gal-Fusionsproteins

Die verschiedenen antigenen Stellen des p150 wurden in pUC-Vektoren kloniert und anschließend in pUR-Vektoren umklontiert. Die pUR-Vektoren besitzen den Promotor und den Operator von lacZ und exprimieren so die β -Galactosidase, die den EBV-Teil vor Proteolyse schützen sollte. Außerdem konnten die Klone, die ein EBV-Insert besaßen, von denen ohne Insert über X-Gal als Farbindikator

unterschieden werden. Die β -gal-Fusionsproteine wurden exprimiert und in der Coomassie-blue Färbung und im Western Blot auf ihre Stabilität und Antigenität getestet. Dabei zeigte der Klon pUR290CXH580 mit dem N-Terminus des p150 die beste Antigenität und wurde für die Reinigung ausgewählt (Motz et al., 1985a) (Abb. 9 von M. Motz).

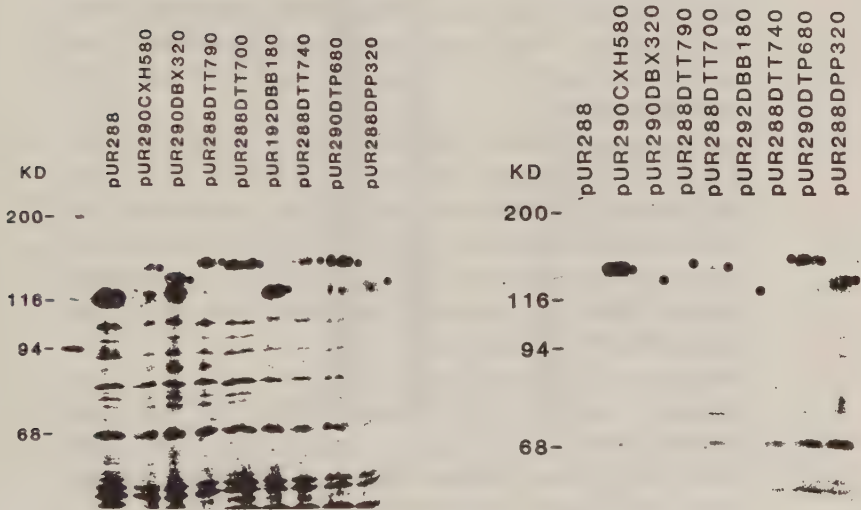


Abb. 9 Expression und Immunogenität der p150-Segmente als β -gal-Fusionsproteine. links: Coomassie-blue gefärbtes 10%iges SDS-PAGE mit IPTG-induzierten Lysaten der p150-Subklone; rechts: dieselben Lysate nach Western Blot und Peroxidasefärbung mit NPC-Pool als Serum; pUR288 als negative Kontrolle. β -gal-Fusionsproteine sind mit schwarzen Punkten gekennzeichnet.

2.3. Reinigung von pUR290CXH580

Das rekombinante Antigen wurde aus einem Liter Bakterienkultur isoliert. Für die Expression des Fremdproteins wurde die Kultur mit IPTG für zwei Stunden induziert. IPTG wirkte als Induktor, so daß der lac-Repressor inaktiviert wurde und nicht mehr an den Operator binden konnte. Da das Fremdgen unter der Kontrolle des lac-Repressors stand, wurde es erst nach Zugabe von IPTG angeschaltet. Mit diesem System können Bakterien ohne Störung durch toxische Nebenprodukte von fremden Genen wachsen, und die Expression des Fremdproteins erfolgt erst durch Induktion.

Das Molekulargewicht des β -gal-Fusionsproteins entsprach dem auf Grund der Basenpaare berechneten Molekulargewicht. Es setzte sich aus der Größe der β -Galactosidase mit 116kD und dem Insert 580bp = 24kD zusammen. Die Coomassie-blue Färbung zeigte jedoch noch zusätzliche Banden mit einem Molekulargewicht, das dem der β -Gal entsprach. Es dürfte sich dabei um Abbauprodukte des Fusionsproteins oder um eine nicht vollständige Translation handeln.

Fusionsproteine haben unabhängig von ihrer Molekülgröße eine schlechtere Löslichkeit als Nichtfusionsproteine. So war auch pUR290CXH580 nur in 8M Harnstoff vollständig löslich. Dieser Effekt wurde für die ersten Reinigungsschritte und die Anreicherung des Proteins benutzt (Abb. 10, Abb. 11).

Ein großer Teil der bakteriellen Proteine war bereits in Tris/EDTA/NaCl (TEN) (Abb. 10 Spur B) bzw. nach Zusatz von 0.5% Triton (Abb. 10 Spur C) zu diesem Puffer löslich. Diese löslichen Proteine konnten vom unlöslichen viralen Protein durch Zentrifugation abgetrennt werden. Das angereicherte Fusionsprotein wurde dann über Phenylsepharose weiter gereinigt. Phenylsepharose ist ein kreuz-vernetztes (cross-linked=CL) Agarosegel mit hydrophoben Phenylgruppen. Der Trenneffekt beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Gelmatrix und Probe. Eine Verminderung der Ionenstärke oder der Polarität des Eluenten bewirkt eine Ablösung der wäßrigen Komponenten von der Matrix (Abb. 12).

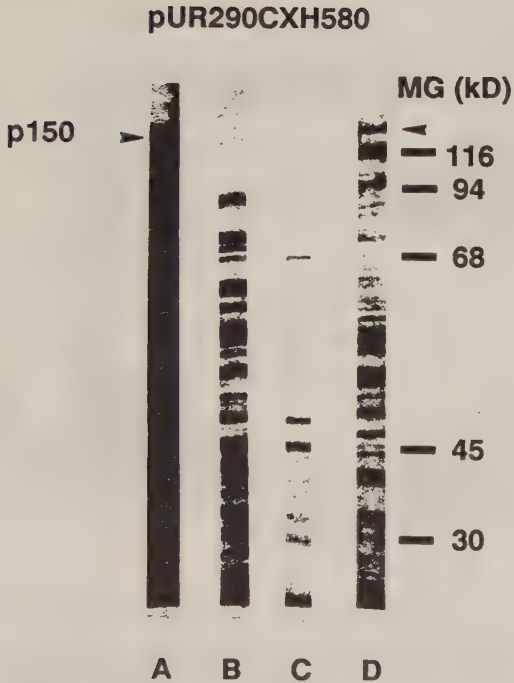


Abb. 10 Coomassie-blue gefärbtes 15%iges SDS-PAGE von pUR290CXH580. Mit Pfeil ist das β -gal-Fusionsprodukt gekennzeichnet. Spur A: gesamtes Bakterienlysat; Spur B: in TEN lösliche Proteine; Spur C: in TTEN lösliche Proteine; Spur D: in 8M Harnstoff/TEN lösliche Proteine

pUR290CXHS80

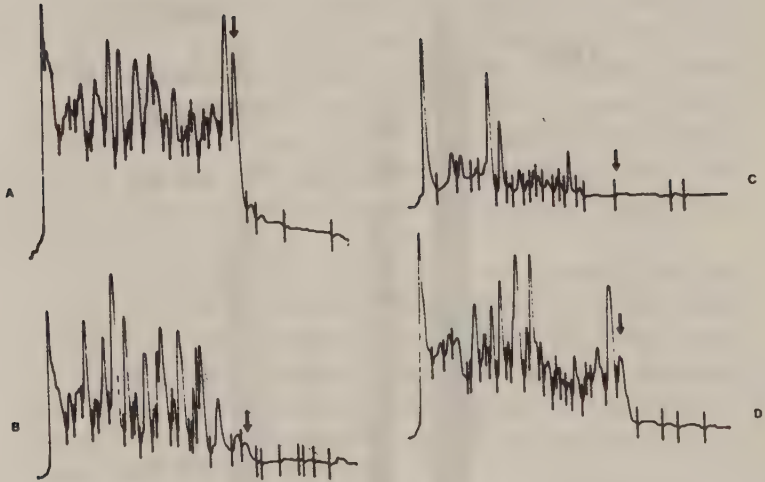


Abb. 11 Densitogramme der Spuren A-D von Abb. 10. Die Messung erfolgte im Densitometer bei $\lambda=366\text{nm}$ ohne Basislinienkorrektur; die Pfeile kennzeichnen das $\beta\text{-gal-Fusionsprotein}$

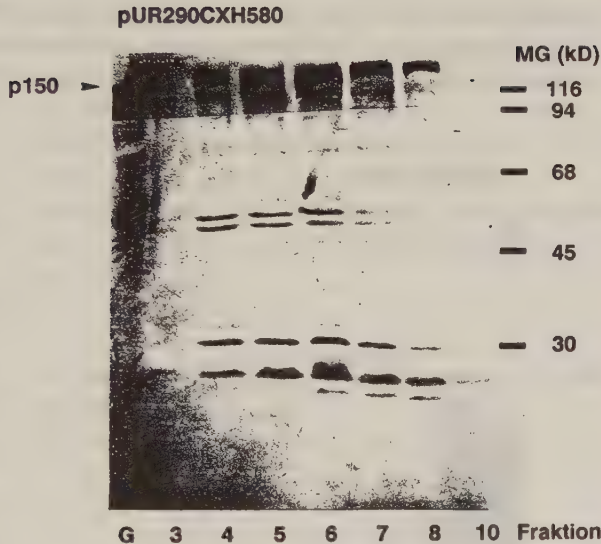


Abb. 12 Western Blot eines 20%igen SDS-PAGE nach Trennung des Extraktes D (s. Abb. 10) über Phenylsepharose. Spur G: Gesamtextrakt = Extrakt D; alle weiteren Spuren sind mit ihrer Fraktionsnummer bezeichnet. Es wurden nur die ungebundenen Fraktionen (Fraktion 3-8) und der Beginn des Gradienten in Fraktion 10 dargestellt.

Das β -gal-Fusionsprotein band nicht an die Phenylsepharose, was auf ein relativ hydrophiles Protein schließen ließ. Hydrophobe Proteine im Molekulargewichtsbereich 30-45kD konnten erst bei 50% Ethylenglykol eluiert werden (nicht gezeigt). Die den p150-Teil besitzenden Fraktionen 4-8 wurden vereinigt und einer Anionenaustausch-Chromatographie unterworfen. Ebenso wurde der Extrakt D in 8M Harnstoff/TEN (Abb. 13) über den Anionenaustauscher Mono Q (HPLC) getrennt. Das VCA-Protein band in beiden Fällen an die Säule und konnte mit 0.2M NaCl eluiert werden. Es konnte jedoch keine Trennung der β -Galactosidase von dem β -gal-Fusionsprotein erreicht werden. Beide Proteine reagierten im

Western Blot mit menschlichen Seren (nicht gezeigt). Die Überprüfung der Reinheit des Proteins in der Silberfärbung (Abb. 13) zeigte zwar eine starke Anreicherung des p150-Teils, aber keine vollkommene Abtrennung von den E.coli Proteinen.

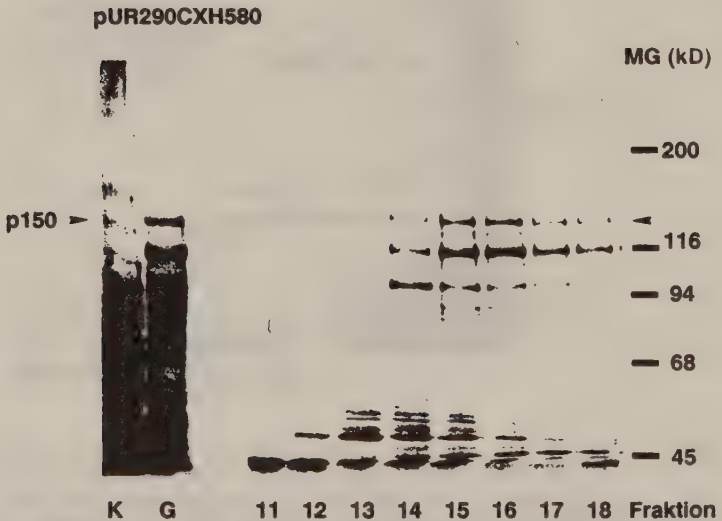


Abb. 13 Silberfärbung eines 10%igen SDS-PAGE nach Trennung des Extraktes D (s. Abb. 10) von pUR290CXH580 über Mono Q. Der lineare Salzgradient reichte von 0-1M NaCl; das Fusionsprotein (Pfeil) wurde bei 0.2M NaCl eluiert. Spur K: neg. Kontrolle pUC8; Spur G: Gesamtextrakt = Extrakt D; die weiteren Spuren zeigen die Fraktionen 11-18 in einem Bereich des Gradienten von 0.1-0.3M NaCl.

Da wegen der großen chemischen Ähnlichkeit zwischen der β -Galaktosidase und dem Fusionsprotein keine weitere Trennung über Molekulargewicht oder Hydrophilizität zu erwarten war, wurde die Elektroelution als nächster Reinigungsschritt gewählt. Dazu wurde die über Mono Q-Säule vorgereinigte und angereicherte Probe in einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, die β -gal-Fusionsbande berechnet,

ausgeschnitten und bei 200V eluiert. Mit diesem Eluat wurde ein ELISA aufgebaut. Da sehr viele Patienten Antikörper gegen β -Galactosidase besitzen, war es wichtig, diese den Test verfälschende Reaktion zu unterbinden. Dazu wurden zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen:

- Blockierung der anti- β -gal-Antikörper in den Patientenseren mit verschiedenen Konzentrationen (20 μ g/ml, 40 μ g/ml, 80 μ g/ml) an β -Galactosidase
- Inkubation des β -gal-Fusionsproteins mit verschiedenen Konzentrationen an anti- β -gal-Antikörper (2 μ g/ml, 1 μ g/ml) (Abb. 14)

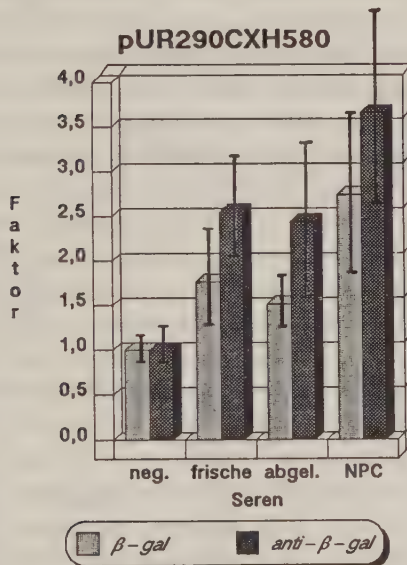


Abb. 14 Balkendiagramme des ELISA-Tests mit 20 μ g/ml β -Galactosidase und mit 2 μ g/ml anti- β -gal-Antikörpern. Es wurden jeweils die OD-Werte der verschiedenen Serengruppen (negativ, frisch, abgelassen, NPC) mit je 23 Seren gemittelt und als Faktor mit dem Bezugspunkt negative Seren $F = 1$ aufgezeichnet, zusätzlich ist die Standardabweichung miteingezeichnet.

Die Präinkubation des Antigens mit der 10fachen Konzentration an anti- β -gal-Antikörpern (bezogen auf das Antigen) ergab eine bessere Spezifität des Tests. Da jedoch für diagnostische Tests jegliche falsch positiven Reaktionen durch β -Galactosidase ausgeschlossen werden müssen, wäre ein β -gal-Fusionsprotein für die Diagnostik nur unter Vorbehalt einzusetzen. Es wurde daher der Versuch unternommen, ein ebenso antigenes Nicht-Fusionsprodukt zu konstruieren.

2.4. Klonierung und Expression von pINDUAH375

Auf Grund der DNA-Sequenz und der Ergebnisse über die Antigenität der pUC- und pUR-Klone bei der Konstruktion des β -gal-Fusionsproteins, wurde das N-terminale Stück des p150 für die neue Klonierung ausgewählt. Als Vektoren wurden pINDU und pUC8 benutzt. Der pINDU-Vektor enthielt zwei Indikatorgene, die Chloramphenicol-acetyltransferase (cat) und die Dihydrofolat-Reduktase (dhfr), die vom β -Lactamase Promotor (bla) kontrolliert wurden. Die Produkte der beiden Indikatorgene werden in E.coli in großen Mengen toleriert. Die Gene besitzen nur 665 bzw. 745bp und sind damit wesentlich kleiner als das β -Galactosidase-Gen. Die Fusionsproteine konnten damit leichter gereinigt werden, da sie durch die Membran nach Außen geschleust werden (Hurt et al., 1984), was für die Reinigung des Proteins vorteilhaft war. Um den N-terminalen Teil des p150 aus pUC18CXH580 (Motz, Diss., 1986) in den pINDU-Vektor in richtiger Orientierung zu bekommen, war zuerst eine Umklonierung in pUC8 als Vektor notwendig (Abb. 15). pUC18CXH580 enthielt 580bp des p150 mit den Schnittstellen XhoI und HindIII. XhoI schneidet die Sequenz 36bp vor dem Translationsstart, d.h. der Klon kodierte noch 12 Aminosäuren aus der untranslatierten Region am 5'-Ende. Der pINDU-Vektor wurde mit EcoRI und HindIII verdaut. Das Fragment enthielt noch 27bp vor dem ATG, dem Beginn der dhfr. Dieses 703bp große Fragment wurde zwischen EcoRI und HindIII des pUC8-Vektors kloniert.

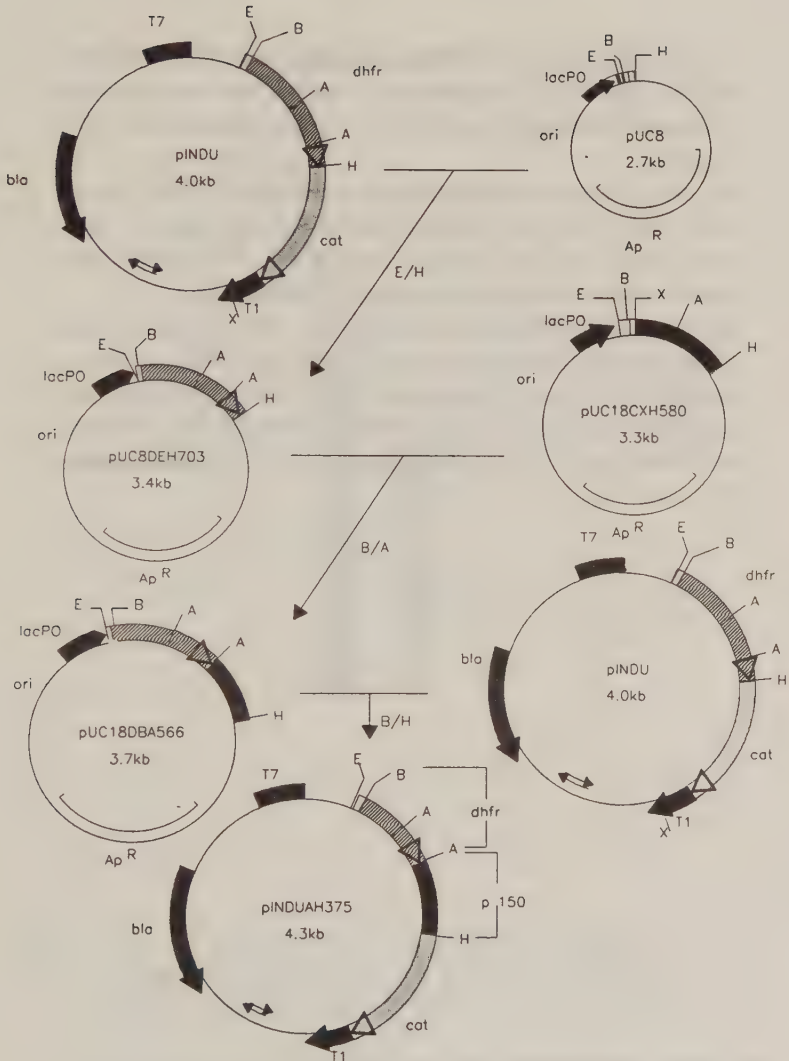


Abb. 15 Konstruktion von pINDUAH375. Ausgangsplasmide waren pINDU, pUC8 und pUC18CXH580. Abkürzungen: A=AccI; B=BamHI; E=EcoRI; H=HindIII; Hc=HincII; X=XhoI

Der entstandene Subklon pUC8DEH703 enthielt damit die gesamte dhfr. 84% der dhfr wurden anschließend mit BamHI und partiellem AccI-Verdau aus pUC8DEH703 geschnitten und in pUC18CXH580 als Vektor eingesetzt.

Der neue Subklon pUC18DBA566 besaß damit einen Teil der dhfr und 375bp (von AccI bis HindIII) des p150. Der Subklon wurde charakterisiert, und der dhfr-Teil zusammen mit dem p150-Teil über einen BamHI/HindIII-Verdau in den pINDU-Vektor kloniert.

Der Klon pINDUAH375 besitzt einen Teil der dhfr mit der ribosomalen Bindungsstelle (RBS), dahinter den p150-Anteil und anschließend das cat-Gen. Die Klone wurden charakterisiert und jene mit dem p150-Insert ausgewählt. Diese Klone wurden in Coomassie-blue gefärbten Gelen bzw. im Western Blot auf ihre p150-Expression und ihre Antigenität getestet (Abb. 16).

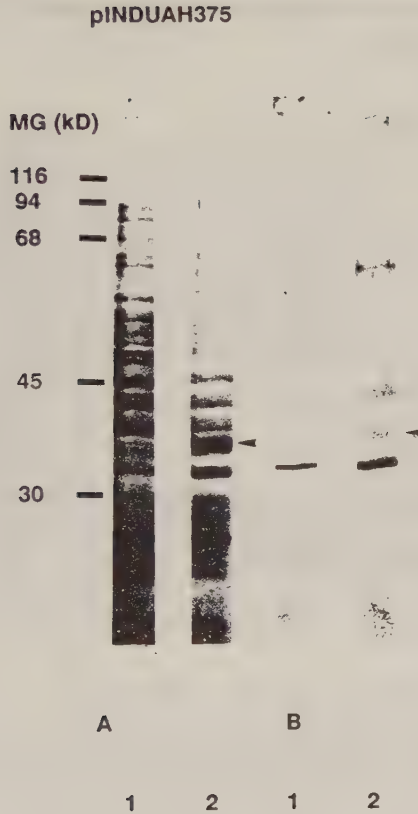


Abb. 16 Coomassie-blue gefärbtes (A) 15%iges SDS-PAGE sowie der dazugehörige Western Blot (B) von pINDUAH375. Spur 1: neg. Kontrolle (pINDU ohne Insert); Spur 2: pINDUAH375; der Pfeil markiert das p150-Fragment

Ausgehend von dergleichen Proteinkonzentration zeigte der Vergleich des pINDU-Vektors ohne Insert mit dem des Vektors mit Insert, daß 32.2% der gesamten Proteinmenge auf den p150-Teil fiel (Abb. 17B). Der

pINDU-Proteinanteil dagegen lag bei diesem Molekulargewicht nur bei 0.3% (Abb. 17A).

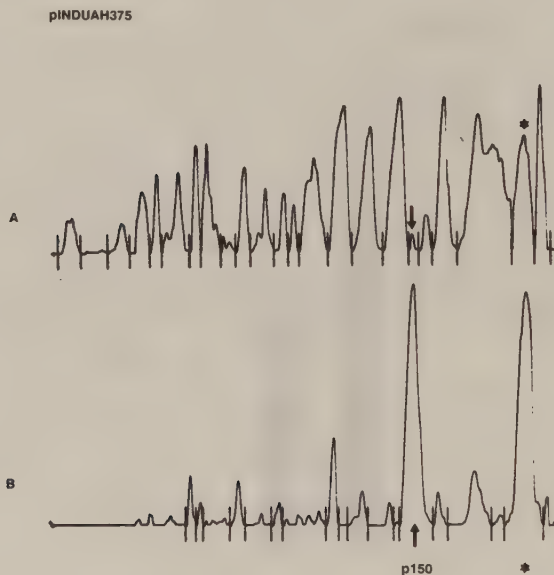


Abb. 17 Densitogramme der Spuren A1 und A2 aus Abb. 16. Die Aufzeichnung erfolgte im Densitometer bei $\lambda=366\text{nm}$ mit Basislinienkorrektur; A: pINDU ohne Insert; B: pINDUAH375; der Pfeil kennzeichnet das p150-Fragment; der Stern die Lauffront des Gels.

Die Antigenität des Konstrukts war relativ schwach. Die Reinigung des rekombinanten Antigens über Kationenaustauscher S-Sepharose fast flow (Pharmacia) zeigte, daß das Konstrukt zudem noch äußerst instabil war und nur mehr in sehr geringem Anteil wiedergefunden werden konnte (Abb. 18). Auch der Zusatz von weiteren bzw. anderen Proteaseinhibitoren konnte keine stabile Expression bewirken. Da die schwache Antigenität wahrscheinlich durch den geringen, 375bp großen

p150-Anteil bedingt war, wurde nach einem immunogeneren und stabileren Konstrukt gesucht.

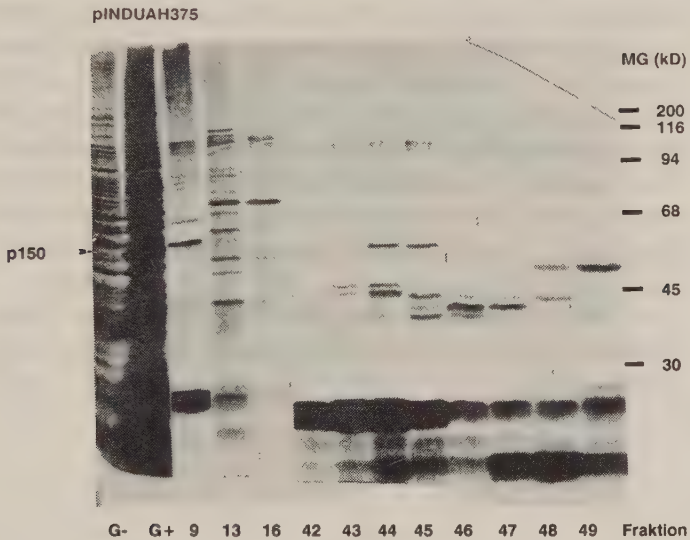


Abb. 18 Silberfärbung eines 15%igen SDS-PAGE von pINDUAH375 nach Trennung über S-Sepharose fast flow. Spur G-: pINDUAH375 nicht induziert (neg. Kontrolle); Spur G+: pINDUAH375 induziert mit IPTG (pos. Kontrolle und Ausgangsmaterial); alle weiteren Spuren sind mit ihrer Fraktionsnummer gekennzeichnet und zeigen den Verlauf der Trennung im Gradienten von 0-1M NaCl. Das p150-Fragment findet sich in Fraktion 44/45 (Pfeil).

2.5. Klonierung von pUC18B640/620

Um die Antigenität zu steigern, wurde der N-terminale Teil des p150 und ein Teil aus der Mitte des Genoms zusammen kloniert. Der mittlere Teil wurde auf Grund der Klonierungen und Expressionsversuche von M. Motz (Motz, Diss., 1986) ausgewählt. Der Klon pUC8DTT700 zeigte dort die beste Expression und Immunogenität und diente bei der folgenden

Klonierung als erster Vektor. Für die Klonierung des N-terminalen Stückes wurde der Klon pUC19cD benutzt, der das gesamte p150 enthielt. pUC8DTT700 wurde zuerst mit BamHI und HindIII verdaut. Das dabei entstandene Fragment enthielt 700bp des VCAs und an beiden Enden noch wenige Basenpaare des pUC8. Dieses Stück wurde mit AluI/HindIII nachverdaut. Das entstandene 620bp große VCA-Stück wurde in pUC18 als Vektor, der mit HincII und HindIII geöffnet wurde, eingesetzt. Der Subklon pUC18HcH620 wurde mit BamHI geschnitten und durch Zugabe von Phosphatase vor Rekombination geschützt. Aus pUC19cD wurde der N-terminale Teil des p150 einschließlich des untranslatierten Bereichs am 5'-Ende des Genoms mit BamHI geschnitten und mit pUC18HcH620 ligiert (Abb. 19).

Die Klone pUC18B640/620 wurden charakterisiert, um die richtige Orientierung des 640bp großen BamHI-Fragments zu bestimmen (nicht gezeigt).

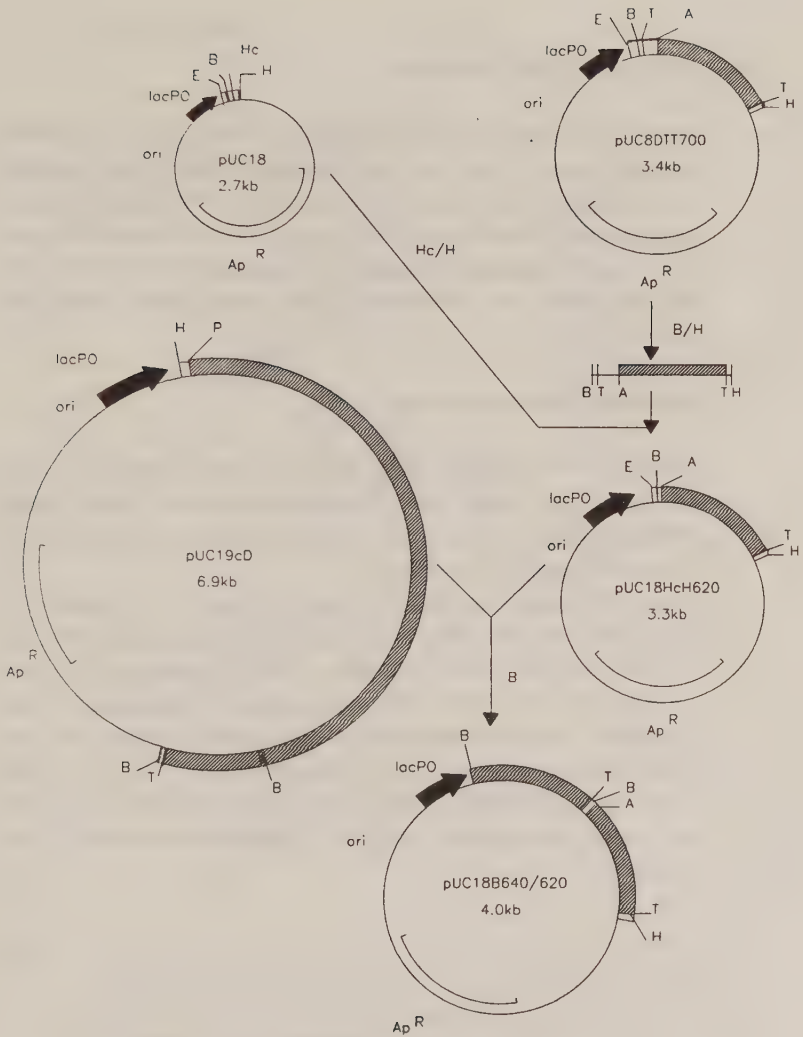


Abb. 19 Konstruktion des Fusionsproteins pUC18B640/620. Ausgangsklone waren pUC19cD und pUC8DTT700; Abkürzungen: A=AluI; B=BamHI; E=EcoRI; H=HindIII; Hc=HincII; T=TaqI.

2.6. Expression von pUC18B640/620

Das Konstrukt wurde auf eine stabile Expression getestet. Im Coomassie-blue Gel war auf Grund der vielen E.coli Banden im Bereich von 45kD keine zusätzliche Bande zu erkennen. Im Western Blot dagegen reagierte der Klon pUC18B640/620 gut (nicht gezeigt). Das Konstrukt besaß damit die erwartete verbesserte Antigenität im Vergleich zu pINDUAH375. Die Expressionsstärke des β -gal-Fusionsproteins wurde jedoch nicht ganz erreicht.

2.7. Reinigung von pUC18B640/620

Der mit IPTG induzierte Bakterienextrakt wurde fraktioniert gelöst (Marston et al., 1984). Die in verschiedenen Puffern (TEN; TTEN; Harnstoff/TEN) löslichen Proteine wurden im Western Blot getestet und ihre Densitogramme aufgezeichnet.

Das p150-Fragment war kaum in 50mM Tris/1mM EDTA/50mM NaCl bzw. TEN mit 0.5% Triton X-100 löslich. Der überwiegende Teil des Proteins löste sich erst in 8M Harnstoff/TEN. Dadurch ließ sich das Protein schon vor einer chromatographischen Auftrennung stark anreichern. Der p150-Anteil betrug in der Harnstoff-Fraktion 25.9% des Gesamtproteins, während er in der TEN-Fraktion nur 1.3% bzw. in der TTEN-Fraktion 4.5% betrug (Abb. 20). Die Harnstoff-Fraktion wurde für die weitere Reinigung mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie verwendet.

pUC18B640/620

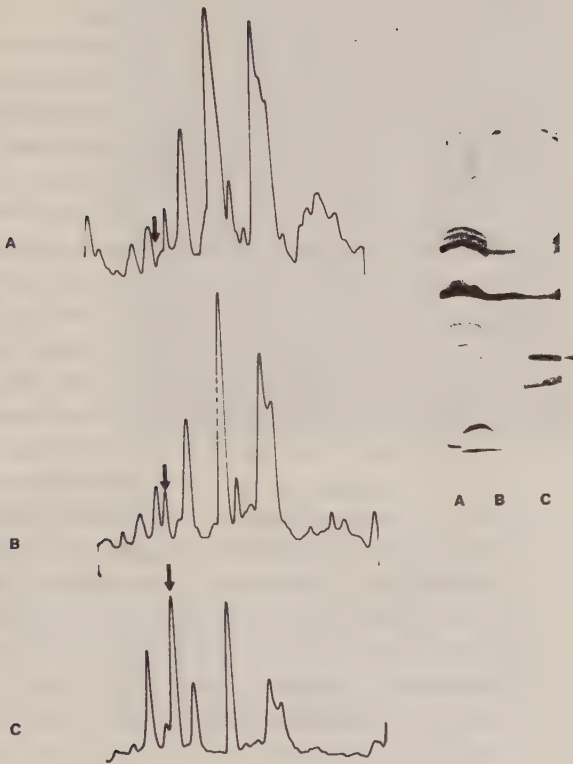


Abb. 20 Western Blot von verschiedenen löslichen Proteinen des pUC18B640/620 mit den dazugehörigen Densitogrammen. A: in TEN lösliche Proteine; B: in TTEN lösliche Proteine; C: in Harnstoff/TEN lösliche Proteine; linker Teil: Messung im Densitometer bei $\lambda=366\text{nm}$ ohne Basislinienkorrektur aufgenommen; rechter Teil: Western Blot eines 15%igen SDS-PAGE mit NPC-Pool als erstem Antikörper und Peroxidase-markiertem anti-IgG-Antikörper als zweitem.

2.7.1. Trennung über den Kationenaustauscher Mono S

Die Trennung wurde bei pH6.8 mit Phosphatpuffer durchgeführt, ohne zuvor die Säurelöslichkeit zu bestimmen. Dazu wurde die Harnstoff-Fraktion über Sephadex G-25 umgepuffert. Da die Probe in 50mM Phosphatpuffer nicht mehr vollständig löslich war, wurde 0.5% SDS zugesetzt. Das Protein ging daraufhin wieder in Lösung. Für die Trennung in der HPLC wurde ein linearer Salzgradient angelegt, der von 0-1M NaCl reichte. Der VCA-Anteil band bei diesen Bedingungen nicht an die Säule. Da im Molekulargewichtsbereich um 45kD sehr viele E.coli-Proteine sowie das spezifische VCA-Protein waren, war eine Zuordnung bzw. Erkennung des spezifischen Proteins über das Molekulargewicht nur sehr schwer möglich. Es wurde daher für die Charakterisierung ein zweifarbiges Western Blot angefertigt. Bei der ersten Färbung mit Diaminobenzidin (braune Banden) wurden die Antigene mit normalem Kaninchenserum inkubiert und mit Peroxidase-markiertem anti-Kaninchen IgG-Antikörper gekoppelt. Das Bandenmuster entsprach der Reaktion des Kaninchensersums mit den E.coli Proteinen, nicht jedoch der Reaktion mit dem EBV-Protein. Im zweiten Teil des Tests wurde derselbe Western Blot mit einem Serum eines gegen VCA immunisierten Kaninchens inkubiert. Als zweiter Antikörper diente ein Phosphatase-markierter anti-Kaninchen Ig-Antikörper. Nach der Färbung zeigte die blaue Bande das spezifische Protein an (Abb. 21).

pUC18B640/620

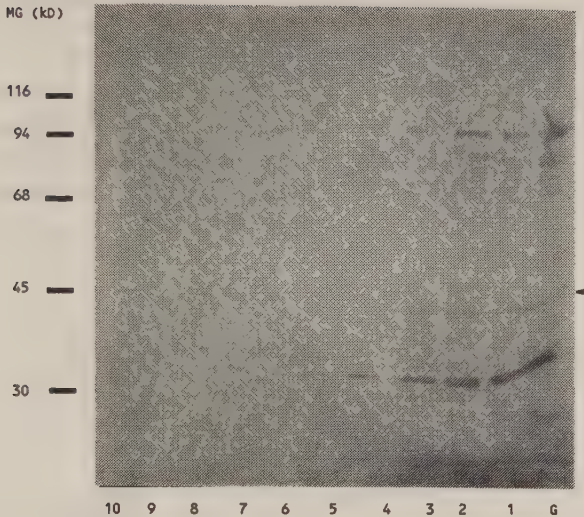


Abb. 21 Zweifarbiger Western Blot eines 15%igen SDS-PAGE von pUC18B640/620 nach Trennung über Mono S. braune Banden: mit normalem Kaninchenserum und Peroxidase-markiertem anti-Kaninchen IgG durchgeführte Immunreaktion; blaue Bande: mit VCA-immunisiertem Kaninchenserum und Phosphatase-markiertem anti-Kaninchen Ig durchgeführte Immunreaktion; Spur G: Gesamtextrakt vor der Trennung; weitere Spuren sind durch die Fraktionsnummer gekennzeichnet. Das p150-Fragment ist durch den Pfeil markiert.

Als Kontrolle, daß das Kaninchen wirklich während der Immunisierung Antikörper gegen VCA gebildet hat, wurde mit dem Serum eine Immunpräzipitation durchgeführt. Als Zellextrakte wurden die EBV-positiven superinfizierten Raji-Zellen und die EBV-negativen BJA-B-Zellen benutzt. Um die Zuordnung der Banden zu erleichtern und den Erfolg der Superinfektion und radioaktiven Markierung zu kontrollieren, wurde die Immunpräzipitation auch noch mit einem Serumpool aus

Seren von NPC-Patienten durchgeführt (Abb. 22). Das Kaninchenserum präzipitierte spezifisch das p150-Antigen.

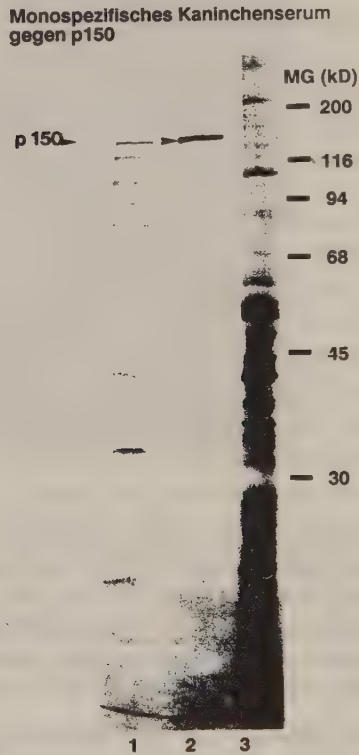


Abb. 22 Immunpräzipitation und 15%iges SDS-PAGE; Spur 1: Extrakt von SI-Raji mit NPC-Pool; Spur 2: Extrakt von SI-Raji mit Kaninchenserum; Spur 3: Extrakt von BJA-B mit NPC-Pool

2.7.2. Trennung über Reversed Phase

Dazu wurde der Proteinextrakt C in 8M Harnstoff/TEN (Abb. 20C) auf 2M Harnstoff/10mM Tris pH7.5/0.5% SDS umgepuffert.

Als Reversed Phase-Säule für die HPLC wurde eine Lichrosorb RP2 (Merck) benutzt. Lichrosorb RP2 besteht aus einer Kieselgelmatrix, die mit Dimethyl-dichlorsilan modifiziert ist. Der Ausgangspuffer für den Gradienten war Wasser mit 0.1% TFA. Durch Zugabe von steigenden Mengen an Acetonitril/0.1%TFA wurde die Polarität der Liganden an der Säulenmatrix verändert. Die gebundenen Proteine wurden eluiert. Das p150-Konstrukt wurde durch die Zugabe von SDS noch zusätzlich polarisiert (Abb. 23).

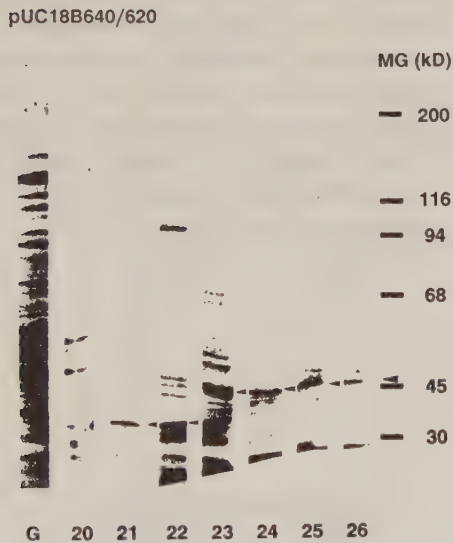


Abb. 23 Western Blot eines 12.5%igen SDS-PAGE von pUC18B640/620 nach Trennung über Lichrosorb RP2; G: Gesamtextrakt; die Spuren sind mit der jeweiligen Fraktionsnummer bezeichnet; die Pfeile zeigen auf die beiden p150-Produkte

Die Probe konnte gut an die Säule binden, und wurde mit 65% Acetonitril eluiert. Die Auswertung der Fraktionen im SDS-PAGE und Western Blot zeigte in den Fraktionen 21 und 22 eine starke immunogene Reaktion mit einer 40kD-Bande, die damit im Molekulargewicht kleiner als die eigentlich erwartete Bande war. In den anschließenden Fraktionen 23-26 war die erwartete Immunreaktion mit einer Bande bei einem Molekulargewicht von 46kD.

Der kleine immunogene Teil war im Ausgangsprodukt nicht vorhanden. Es handelte sich damit vermutlich um ein Degradationsprodukt der 46kD-Bande. Die Coomassie-blue Färbung zeigte in den positiven Fraktionen neben dem p150-Fragment noch ein Spektrum an E.coli-Banden.

Die Auswertung der gefärbten Gelstreifen im Densitometer ergab, daß im Gesamtextrakt der p150-Anteil 14.8% betrug, im eluierten Zustand, d.h. nach Trennung über Lichrosorb RP2, war in Fraktion 23 28.3% des gesamten Proteins p150-Protein. Das Abbauprodukt besaß in Fraktion 22 einen Anteil von 20.9% am Gesamtprotein (Abb. 24).

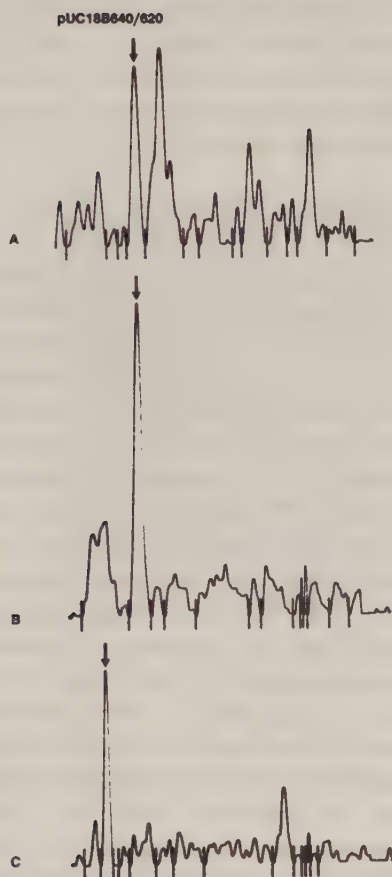


Abb. 24 Auswertung über Densitometer von pUC18B640/620; A=Gesamtextrakt; B=gereinigtes Produkt aus Fraktion 23; C=Abbauprodukt aus Fraktion 22

Die Antigenität des Eluats war wesentlich schwächer als die des Ausgangsmaterials. Eventuell wurde das Protein durch den stark sauren pH-Wert während des Laufs so stark in seiner Tertiärstruktur verändert, daß es sich bei der Neutralisation nicht mehr richtig zurückfalten konnte. Es wurde daher nach einer schonenderen Reinigung gesucht.

2.7.3. Trennung über Mono Q

Als Ausgangsmaterial wurde wieder das in 8M Harnstoff/TEN lösliche Lysat (Abb. 20C) benutzt. Der lineare Gradient verlief von 0-1M NaCl in 8M Harnstoff/TEN. Es wurde noch PMSF und 1% Pepstatin A zugesetzt, um das Protein vor einem Abbau zu schützen. Die Fraktionen wurden im Durchflußphotometer sowohl bei $\lambda=275\text{nm}$ als auch bei $\lambda=226\text{nm}$ gemessen. Dabei war in Fraktion 22 ein gravierender Unterschied in der optischen Dichte festzustellen. Bei $\lambda=226\text{nm}$ war der Peak um das 40fache höher als bei $\lambda=275\text{nm}$. In der Silberfärbung und im Western Blot wurde bei diesem Peak das p150-Fragment nachgewiesen (nicht gezeigt). Der Western Blot mit zwei negativen und zwei EBV-positiven Seren zeigte die Spezifität der Reaktion (Abb. 25a). Die Aminosäuresequenz in dem 640bp- und dem 620bp-Stück des p150 wies nur 1.1% bzw. 1.7% an aromatischen Aminosäuren auf. Damit ließ sich die geringe Adsorption bei $\lambda=275\text{nm}$ erklären, da nur Aromaten und nicht Aliphaten in diesem Bereich adsorbieren. Da die Silberfärbung neben der spezifischen Bande noch Reaktionen mit E.coli-Proteinen zeigte, wurden die Fraktionen 21-23 vereinigt, über Ultrafiltration eingeeengt und nochmals über die Mono Q-Säule geschickt. Der Gradient wurde etwas flacher gelegt, um die Trennleistung zu steigern. Puffer und die weiteren Trennbedingungen blieben unverändert. Die einzelnen Fraktionen wurden in der Silberfärbung und im Western Blot mit p150-spezifischem Kaninchenserum und mit Phosphatase-markiertem

anti-Kaninchen-Immunglobulin getestet. Die p150-Probe war eindeutig von den übrigen E.coli-Proteinen abgetrennt (Abb. 25b).

Abb. 25a

Abb. 25b

pUC18B640/620

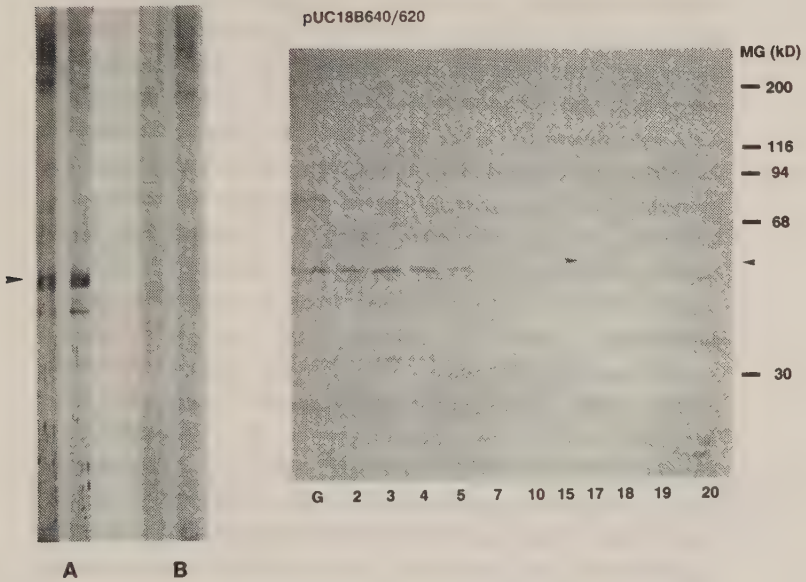


Abb. 25a Western Blot eines präparativen 15%igen SDS-PAGE; A: EBV-positive Seren; B: EBV-negative Seren

Abb. 25b Western Blot eines 15%igen SDS-PAGE von pUC18B640/620 nach Trennung über Mono Q. G=Gesamtextrakt, die weiteren Zahlen geben die jeweiligen Fraktionen der Trennung an.

2.8. ELISA mit pUC18B640/620

Mit der aus 2.7.3. gereinigten Fraktion 17 wurde ein ELISA mit je 23 Seren von EBV-negativen Personen, Patienten mit einer frischen EBV-Infektion, Personen mit einer abgelaufenen EBV-Infektion und NPC-Patienten durchgeführt. Aus der Probe wurde durch Dialyse der Harnstoff entfernt, da er die Bindung an die ELISA-Platten teilweise verhindert. Die Antigenkonzentration pro Napf entsprach 30ng. Zum Vergleich mit dem zweiten Lauf wurden auch die positiven Fraktionen des ersten Laufs der Anionenaustausch-Chromatographie im ELISA getestet. Die Spezifität der Fraktionen des zweiten Laufs mit dem flacheren Gradienten war wesentlich höher (nicht gezeigt). Um eine geeignete Serumverdünnung zu bekommen, wurden verschiedene Seren von Personen ohne EBV-Infektion, Patienten mit einer frischen oder abgelaufenen EBV-Infektion und NPC-Patienten titriert. Eine Titration von vier Seren ist in Abb. 26 aufgezeichnet, wobei zu beachten ist, daß die einzelnen Verdünnungsstufen nicht linear auf der X-Achse eingezeichnet wurden, sondern immer denselben Abstand zueinander haben. Bei einer Verdünnung von 1:50 bzw. 1:100 lagen die Werte der EBV-positiven Seren mindestens um einen Faktor 2 über den Werten des negativen Serums. Höhere Verdünnungen eigneten sich nicht für einen ELISA, da die OD-Werte so nieder wurden, daß kein signifikanter Unterschied zu den EBV-negativen Seren mehr gegeben war. Bei einer höheren Konzentration als 1:50 lagen die Werte nicht mehr im linearen Bereich der Farbreaktion.

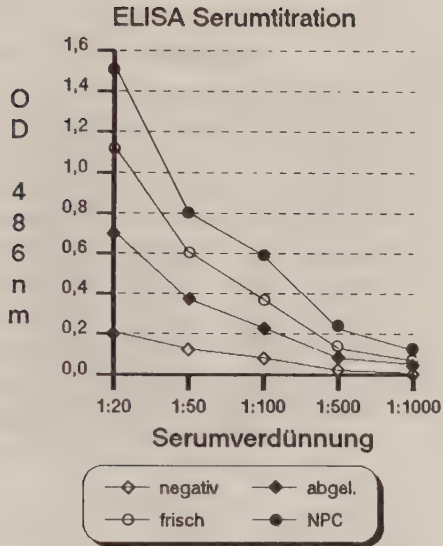


Abb. 26 Graphische Darstellung der OD-Werte bei $\lambda=486\text{nm}$ bei der Serumtitration von je einem Serum einer EBV-negativen Person, je eines Patienten mit einer frischen, einer abgelaufenen EBV-Infektion und eines NPC in den Verdünnungsstufen 1:20, 1:50, 1:100, 1:500 und 1:1000

Das für den ELISA benutzte Antigen (Fraktion 17, 2. Lauf) reagierte sehr gut mit den Antikörpern der Klasse IgA und IgG der verschiedenen Seren (Abb. 27).

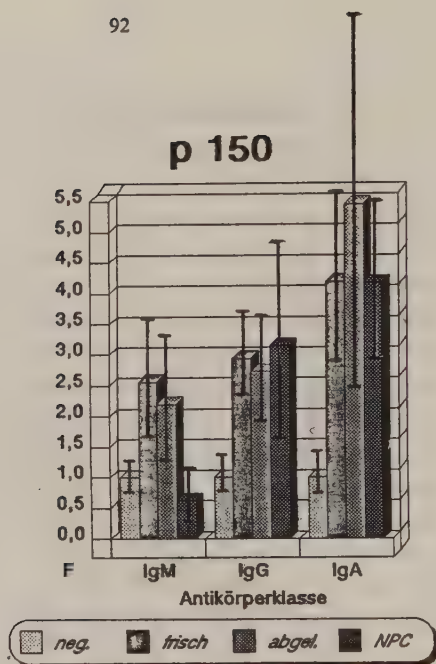


Abb. 27 Balkendiagramm eines ELISAs von pUC18B640/620. Es wurden die OD-Werte der verschiedenen Serengruppen gemittelt, der Mittelwert der negativen Seren als Faktor $F=1$ gesetzt und die anderen Mittelwerte als Faktoren darauf bezogen, zusätzlich ist die Standardabweichung miteingezeichnet; als Antigen diente die Fraktion 17 des 2. Laufs der Trennung über Mono Q

3. Frühes Antigen p138

3.1. Lokalisation auf dem EBV-Genom

Das frühe EBV-Antigen p138 (D-Komponente) wird im BamHI-A Fragment kodiert (Seibl und Wolf, 1985). Auf Grund der Sequenzdaten (Baer et al., 1984) wurden drei mögliche, nach links gerichtete Leserahmen identifiziert, von denen der größte, der BALF2, wegen des kalkulierten Molekulargewichts als der wahrscheinlichste Leserahmen galt. In vitro Translationen mit einem Subklon aus dem Bereich BamHI-A von M. Motz bestätigten BALF2 als den richtigen Leserahmen für p138. Über die schon bei p150 dargestellte Chou-Fasman Vorhersage wurde über die Hydrophilizitätsberechnungen ein Computer Plot angefertigt (Abb. 28). Von den vorhergesagten Bereichen wurden Subklone hergestellt und die Antigenität überprüft (Motz et al., 1986).

ebv138.pap UK: 7805

Chou-Fasman prediction
29-APR-1987 19:19

○ Hydro-Philicity >= 0.7
◇ Hydro-Phobicity <= -0.7

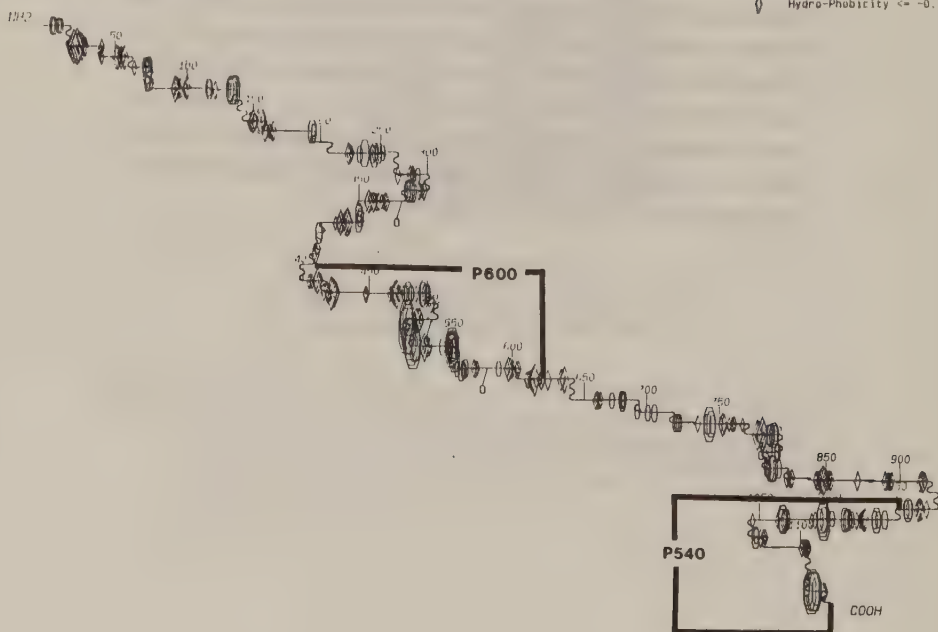


Abb. 28 Computer Plot von p138 mit den jeweiligen antigenen Determinanten der verschiedenen Konstrukte; hydrophobe Bereiche sind als Rauten, hydrophile als Kreise gezeichnet, β -turns sind als 180° Drehungen zu erkennen, die glykosylierten Stellen sind mit O bezeichnet.

3.2. Subklone pUCARG601 und pUCARGNCO

In die Subklone wurden am 5'-Ende des Fusionsfragments fünf Argininreste sowie zwei Codons für einen Translationsstop eingebaut. Das Oligonukleotid aus Arginin ist stark basisch und sollte die Reinigung über Kationenaustauscher erleichtern (Sassenfeld und Brewer, 1984; Smith et al., 1984). Die Stopcodons sollten die Expression der β -Galactosidase verhindern. Die Subklone wurden in L-Broth mit Ampicillin hochgezogen, induziert und lysiert. Das jeweilige Lysat wurde mit Harnstoff bis zu einer Konzentration von 8M versetzt.

Ein Vergleich der Antigenität im Western Blot zeigte, daß pUCARGNCO fast gar nicht reaktiv war; pUCARG601 wurde dagegen sehr gut von einem Serumpool von NPC-Patienten erkannt. Eine Reinigung von pUCARGNCO wurde daher nicht weiter verfolgt. Eine Abtrennung von pUCARG601 über DEAE-Trisacryl bei pH7.5 war nicht möglich. Das p138-Fragment wurde zusammen mit den anderen E.coli-Proteinen eluiert. Daraufhin wurde eine Trennung über Kationenaustauscher bei pH5.2 versucht. Das Protein war bei diesem pH-Wert teilweise unlöslich, so daß es zu einem großen Verlust an Protein kam. Der lösliche Anteil konnte auf der Kationenaustauschersäule SP-Sephadex jedoch aufgetrennt werden (nicht gezeigt).

Bevor eine weitere Reinigung dieses Konstrukts in Betracht gezogen wurde, wurden noch zwei weitere Subklone des p138 gereinigt. Diese beiden Subklone hatten den Vorteil, daß sie zwei antigene Determinanten des p138 enthielten. Da ein zu kurzes Transkript eventuell nicht von allen p138-positiven Seren erkannt wird, wurden diese größeren Konstrukte dem pUCARG601 vorgezogen.

3.3. Subklone pUCARG1140 und pUCARG680

pUCARG1140 enthält den C-terminalen Teil des p138 mit 540bp Länge und einen 600bp großen Teil aus der mittleren Region des p138. pUCARG680 ist ein verkürztes Konstrukt von pUCARG1140. Es wurden

dabei beide antigenen Stellen (540bp; 600bp) verkürzt. pUCARG680 wurde in *E.coli* hochgezogen und nach der Lyse in 8M Harnstoff/20mM Tris pH7.5 gelöst. Das Protein wurde über Anionen- bzw. Kationenaustauscher bei verschiedenen pH-Werten getrennt. pUCARG680 wurde stets als Doppelbande identifiziert. Auffallend war dabei, daß die beiden Banden in ihrem Verhältnis zueinander je nach pH-Wert des Puffers variierten. Im Gesamtextrakt bei pH8.0 waren sie in äquimolaren Mengen vorhanden. Nach der Auftrennung über DEAE-Trisacryl bei pH7.5 wurde die untere Bande nur in den nicht gebundenen Fraktionen wiedergefunden. Die obere Bande war sowohl in den ungebundenen als auch in den gebundenen Fraktionen vorhanden. Bei der Trennung über Kationenaustauscher (SP-Sephadex) fanden sich bei pH5.7 in den ungebundenen Fraktionen beide Proteinbanden, allerdings war das molare Gleichgewicht in Richtung obere Bande verschoben. In den gebundenen Fraktionen wurde die obere Bande nur in sehr geringem Maße, die untere Bande jedoch sehr stark angereichert. Bei pH4.0 war die untere Bande entweder fast völlig abgebaut oder so fest an die Säule gebunden, daß sie mit den gewählten Elutionsbedingungen (1M NaCl) nicht eluiert werden konnte. Die obere Bande fand sich fast ausschließlich in den ungebundenen Fraktionen (Abb. 29).

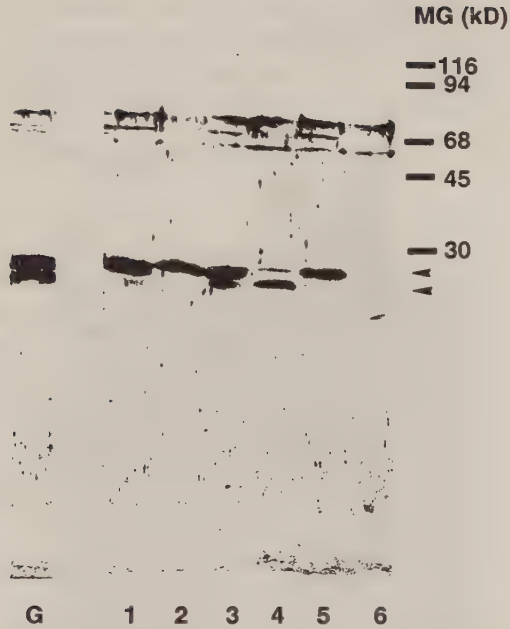
pUCARG680

Abb. 29 Western Blot eines 17.5%igen SDS-PAGE von pUCARG680 nach Trennung über DEAE-Trisacryl und SP-Sephadex; Spur G: Gesamtextrakt; 1: ungebundene Fraktion DEAE; 2: gebundene Fraktion DEAE; 3: ungebundene Fraktion SP pH5.7; 4: gebundene Fraktion SP pH5.7; 5: ungebundene Fraktion SP pH4.0; 6: gebundene Fraktion SP pH4.0

Untersuchungen des isoelektrischen Punkts über zweidimensionale Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot zeigte, daß die obere Bande in drei Modifikationen vorlag, und der isoelektrische Punkt im

neutralen (pH7.0) bis leicht sauren (pH6.2) Bereich lag. Die untere Bande wurde dagegen im basischen Bereich (pH8.0) präzipitiert (Abb. 30).

pUCARG680



sauer

basisch

Abb. 30 Zweidimensionale Gelelektrophorese von pUCARG680 in einem pH-Bereich von 3.5–9.5 mit anschließendem Western Blot; die Pfeile zeigen das p138-Fragment an

Bei der Anionenaustausch-Chromatographie pH7.5 lag damit bei beiden Banden der pH-Wert nahe dem isoelektrischen Punkt, so daß die Proteine in einem ungeladenen bzw. nur sehr schwach geladenen Zustand waren. Damit konnten sie nicht an die Säule gebunden werden. Bei der Trennung über SP-Sephadex pH5.7 war bei einem Teil der oberen Bande der isoelektrische Punkt erreicht. Die obere Bande band somit nicht bzw. nur teilweise an die Säule. Die untere Bande war in einem positiv geladenen Zustand und konnte binden (Abb. 29 und 30).

Die Expression von pUCARG1140 war im Vergleich zu pUCARG680 wesentlich besser. Es war allerdings durch das höhere Molekulargewicht eine schlechtere Löslichkeit des Proteins bzw. eine gewisse Instabilität des Konstrukts zu erwarten. Tatsächlich zeigte sich im Laufe der Zeit eine Abnahme der Expression, wenn der Klon auf Agarplatten ausgestrichen wurde und zwei- bis dreimal ausplattiert wurde. Die Charakterisierung der DNA zeigte eine starke Abnahme der Kopienzahl (Abb. 31).

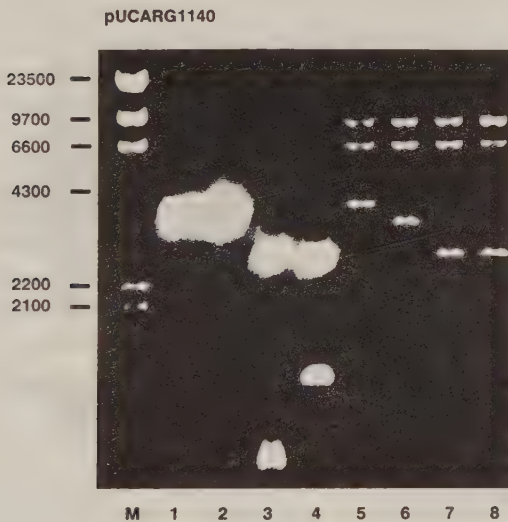


Abb. 31 1%iges Agarosegel mit der DNA von pUCARG1140; M: Marker mit HindIII geschnitten; Spur 1-4: neu transformierter Klon; Spur 5-8: alter Klon; DNA geschnitten mit EcoRI (Spur 1+5), mit PstI (Spur 2+6), mit EcoRI/PstI (Spur 3+7) und mit EcoRI/HindIII (Spur 4+8)

Der Klon wurde daher neu transformiert, und alle p138-Präparationen aus in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Kulturen gewonnen. Unter diesen Bedingungen blieb die Kopienzahl und damit die Expression des p138-

Fragments erhalten. Bei der Aufarbeitung des Bakterienextraktes in den verschiedenen Präparationen wurde außerdem eine unterschiedliche Löslichkeit des Lysats in 8M Harnstoff/20mM Tris pH7.5 festgestellt. Untersuchungen über die Kinetik der Induktion mit IPTG zeigten, daß die Löslichkeit von der Induktionsdauer abhängig war und bei einer Induktion von 120min. oder länger stark abnahm (Abb. 32).

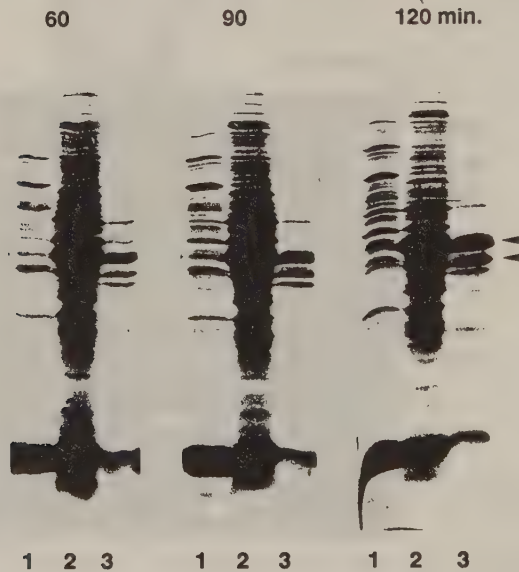


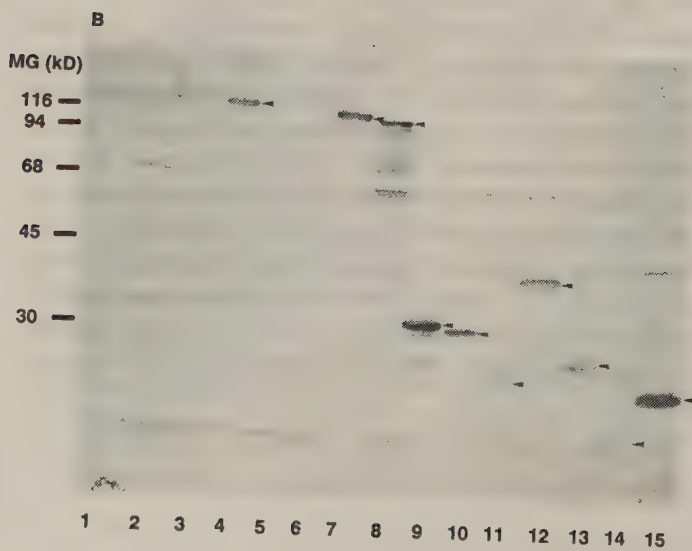
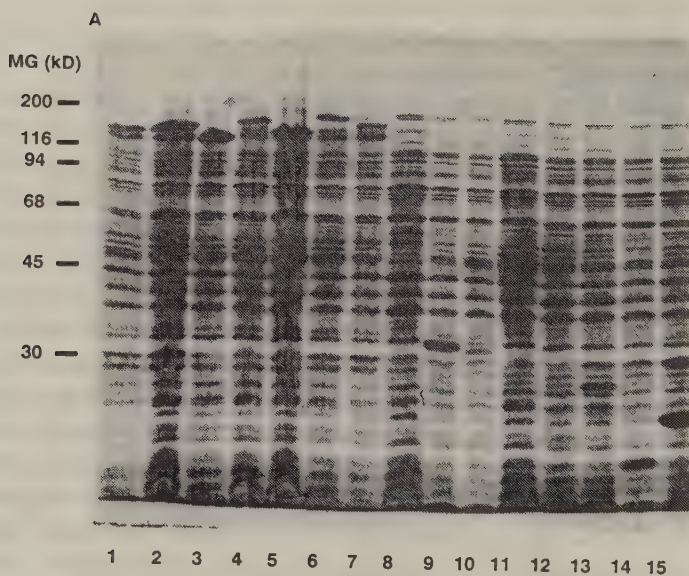
Abb. 32 Coomassie-blue Färbung eines 15%igen SDS-PAGE von pUCARG1140 nach einer Induktionsdauer von 60, 90 und 120 min.; Spur 1: nicht induzierter Bakterienextrakt; Spur 2: induzierter Bakterienextrakt in 8M Harnstoff gelöst; Spur 3: in 8M Harnstoff unlöslicher Bakterienextrakt

Zugleich war der Erfolg der Induktion streng temperaturabhängig. Höhere Temperaturen als 37°C verhinderten eine gute Induktion (nicht gezeigt).

3.4. Monoklonale Antikörper gegen pUCARG1140

Da das Molekulargewicht von pUCARG1140 mit 43kD in einem Bereich liegt, in welchem sehr viele E.coli Proteine exprimiert werden, war es wichtig, eine exakte Zuordnung des p138-Fusionsproteins zu erreichen. Dazu wurde pUCARG1140 über eine Molekularsiebsäule (Sepharose 6B) aufgetrennt. Das p138-Konstrukt kam als erster Peak von der Säule und war stark angereichert (nicht gezeigt). Dieses angereicherte Produkt wurde zur Immunisierung von Mäusen benutzt, um monoklonale Antikörper gegen pUCARG1140 zu erzeugen. Nach der Fusion wurden die einzelnen Klone in der Immunfluoreszenz auf eine Reaktion gegen EA getestet, und die positiven Klone weiter subkloniert. Die Klone wurden anschließend mit den verschiedenen p138-Konstrukten in pUR- und pUC-Vektoren im Western Blot getestet (Abb. 33). Es waren zwei Arten von Klonen selektioniert worden. Die einen Klone erkannten nur das 600bp-Epitop, die anderen nur das 540bp-Epitop. Insgesamt wurde viel häufiger das 540bp-Epitop aus dem C-terminalen Bereich des p138 erkannt als das 600bp-Stück. Als positive Kontrolle wurde ein Western Blot mit NPC-Seren durchgeführt, wobei beide Determinanten erkannt wurden (Abb. 33B). Der monoklonale Antikörper, der das 600bp-Epitop erkannte, reagierte mit allen pUC-Konstrukten, da sie alle das 600bp-Stück enthielten (Abb. 33C). Der monoklonale Antikörper, der das 540bp-Epitop erkannte, reagierte nur mit den Klonen pUC635, pUCARG1140 und pUCARG680. Alle anderen Klone außer pUCARGNCO besitzen diese antigene Determinante nicht. pUCARGNCO enthielt zwar das 540bp-Fragment, es befand sich jedoch nicht im richtigen Leserahmen, so daß es von dem monoklonalen Antikörper nicht erkannt wurde.

Die Reinigung von pUCARG1140 über Affinitätschromatographie mit an CNBr-Sepharose 4B scheiterte, da die Affinitätskonstante zwischen Antigen und monoklonalem Antikörper so hoch war, daß der Komplex nicht mehr getrennt werden konnte, ohne daß das Antigen seine Aktivität verloren hätte.



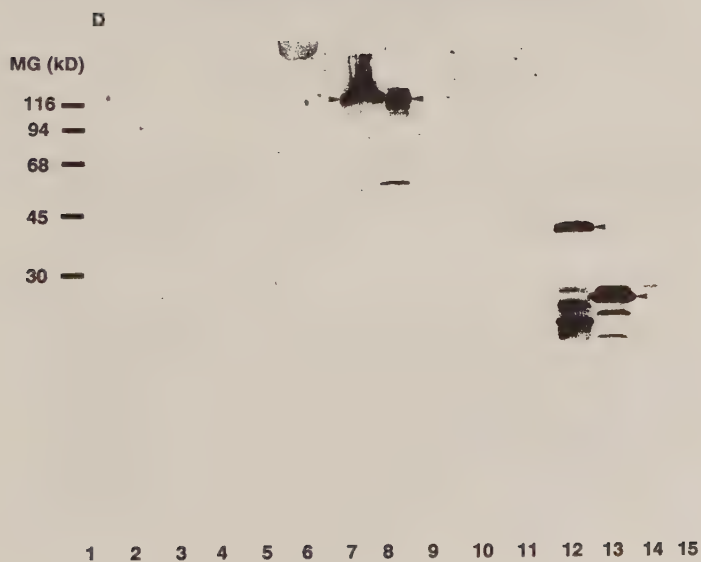
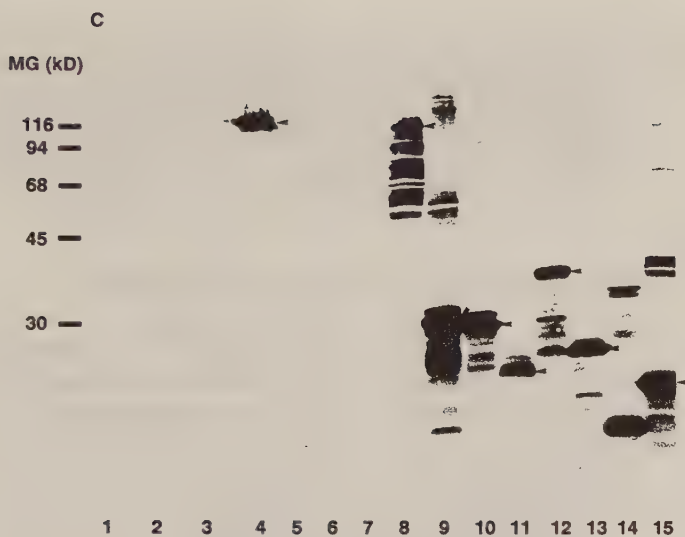


Abb. 33 Coomassie-blue Färbung (A) und Western Blots (B-D) von 15%igen SDS-PAGEs der verschiedenen pUR- und pUC-Klone von p138; A und B: NPC-Serumpool; C: monoklonaler Antikörper gegen das 600bp-Epitop; D: monoklonaler Antikörper gegen das 540bp-Epitop; Spur 1: pURHP; 2: pUR400; 3: pUR380; 4: pUR600; 5: pUR220; 6: pUR750; 7: pUR540; 8: pUC635; 9: pUC600; 10: pUC601; 11: pUCARG601; 12: pUCARG1140; 13: pUCARG680; 14: pUCARGNCO; 15: pMF175

3.5. Trennung pUCARG1140 über Ionenaustausch-Chromatographie

pUCARG1140 wurde bei einer OD von 0.6-0.8 für 90min. induziert und dann lysiert. Es wurde zuerst eine Anionenaustausch-Chromatographie bei pH7.5 mit DEAE-Trisacryl durchgeführt. Der lineare Salzgradient reichte von 0-1M NaCl. Das p138-Fragment wurde an die Säule gebunden und konnte mit 0.2M NaCl eluiert werden (Abb. 34). Für die Kationenaustausch-Chromatographie wurde einmal ein schwacher ("weak") Kationenaustauscher (CM-Sephadex) (Abb. 34) bei pH7.5 und einmal ein starker ("strong") Kationenaustauscher (SP-Sephadex) (Abb. 35) bei pH4.0 benutzt.

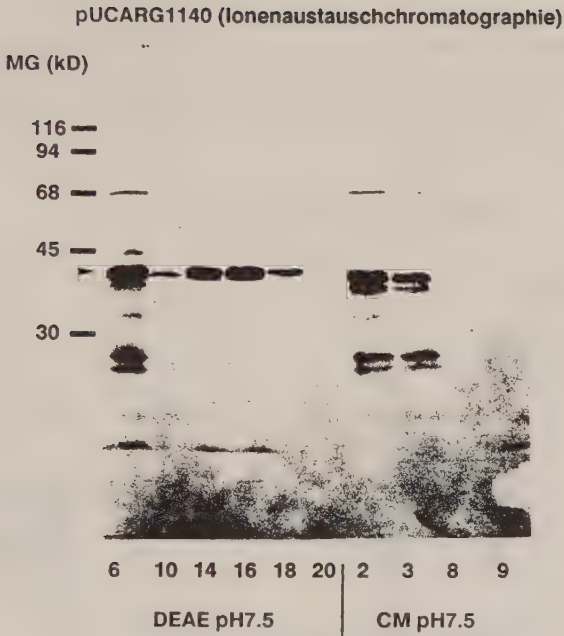


Abb. 34 Western Blot eines 15%igen SDS-PAGE von pUCARG1140 nach Trennung über DEAE-Trisacryl bzw. CM-Sepharose; die Zahlen geben die jeweilige Fraktionsnummer an; der Pfeil kennzeichnet das p138-Fusionsprotein

Das Umpuffern der Probe von pH7.5 auf pH4.0 war äußerst problematisch, da der isoelektrische Punkt des pUCARG1140 bei pH5.2-5.4 lag. Bei diesem pH-Wert präzipitierte das Protein. Auch das schnelle Durchschreiten dieses pH-Bereiches durch Eintropfen der Probe (pH7.5) in ein großes Volumen an Puffer pH4.0 konnte eine Präzipitation nicht verhindern. Ein Bruchteil des p138-Fragments blieb allerdings in Lösung und wurde für eine Trennung benutzt. Es konnte jedoch über

Kationenaustauscher weder bei pH7.5 noch bei pH4.0 eine Bindung des Proteins an die Säule erreicht werden. Das p138-Konstrukt kam zusammen mit den E.coli-Proteinen im Durchlauf der Säule. Die beste Trennung wurde somit mit Molekularsieb und mit Anionenaustauscher erzielt. Eine Kombination dieser beiden Reinigungsschritte sollte demnach ein hoch reines Antigen liefern.

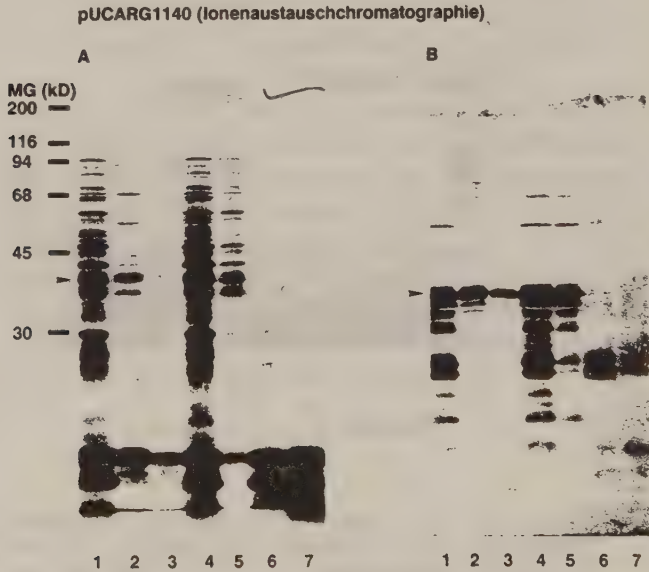


Abb. 35 Coomassie-blue Färbung (A) und Western Blot (B) eines 15%igen SDS-PAGE von pUCARG 1140 nach Trennung über DEAE-Trisacryl (Spur 1-3, bzw. SP-Sephadex (Spur 5-7); Spur 1 und 5: ungebundene Fraktion; Spur 2, 3, 6 und 7: gebundene Fraktionen; Spur 4: Gesamtextrakt; der Pfeil kennzeichnet das p138-Fragment

3.6. Reinigung von pUCARG1140 über zwei Stufen

Als erster Reinigungsschritt wurde die Trennung über die Molekularsiebsäule gewählt. Bei der Gelfiltration ist das Probevolumen abhängig vom Gelvolumen, so daß verdünnte Proben zuerst über Ultrafiltration eingengt wurden. Nach der Trennung über Molekularsieb wurden die positiven Fraktionen vereinigt und auf eine DEAE-Trisacryl-Säule aufgetragen. Bei der Ionenaustausch-Chromatographie war das Auftragsvolumen nicht durch die Gelbetthöhe limitiert, sondern durch die Bindungskapazität der reaktiven Gruppen, da es sich bei dieser Art der Trennung um chemische Einflüsse und nicht um eine physikalische Trennung handelte. Dadurch konnte die durch die Gelfiltration stark verdünnte Probe direkt auf die DEAE-Säule aufgetragen werden. Das p138-Fragment wurde wie üblich an der Säulenmatrix gebunden und konnte mit 0.2M NaCl eluiert werden. Um die Spezifität der gereinigten Bande zu beweisen, wurde ein Western Blot zuerst mit einem EBV-negativen Serum inkubiert und der Antigen-Antikörperkomplex mit einem peroxidase-markierten zweiten Antikörper nachgewiesen (braune Banden). Im zweiten Teil des Versuchs wurde dann derselbe Blot mit einem EBV-positiven Serum inkubiert, ein phosphatase-markierter zweiter Antikörper dazugegeben und abermals gefärbt (blaue Banden). Die durch die Verwendung unterschiedlicher Substrate gefärbten Detektionssignale ließen eine eindeutige Zuordnung der EBV-spezifischen Bande zu (Abb. 36).

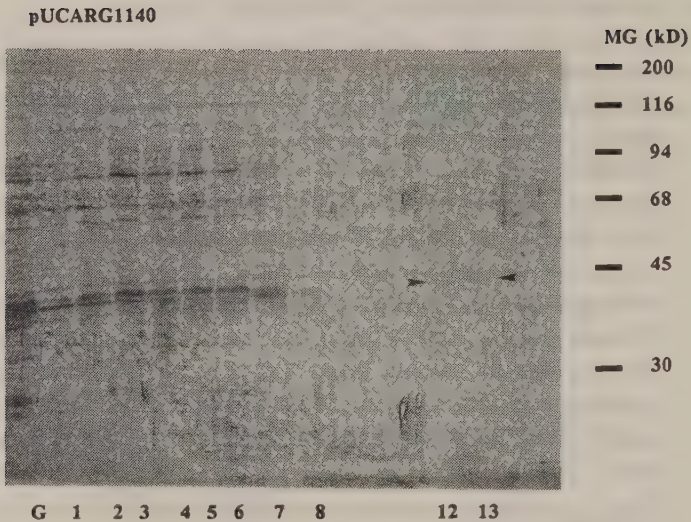


Abb. 36 Doppelt markierter und gefärbter Western Blot eines 15%igen SDS-PAGE. braune Banden: negatives Serum mit peroxidase-markiertem 2. Antikörper; blaue Banden: positives Serum mit phosphatase-markiertem 2. Antikörper; G=Gesamtextrakt, alle weiteren Zahlen geben die Fraktionsnummer an, der Pfeil markiert das p138-Fragment

Die Auswertung mit dem Densitometer von je einer ungebundenen und einer gebundenen Fraktion der DEAE-Trennung nach SDS-PAGE und Coomassie-blue Färbung zeigte, daß die Reinheit des Produkts bei 92% lag (Abb. 37).

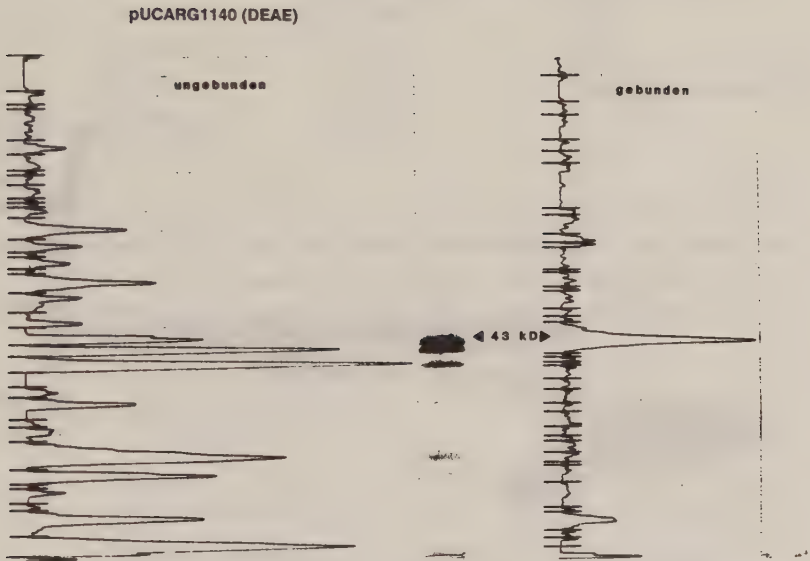


Abb. 37 Coomassie-blue gefärbte Gelstreifen einer ungebundenen und einer gebundenen Fraktion der DEAE-Trisacryltrennung und deren Auswertung über Densitometer bei $\lambda=366\text{nm}$.

3.7. Trennung über Mono Q (HPLC)

Da das Zwei-Stufen-Reinigungsverfahren zeitlich sehr aufwendig war, und die Proben damit relativ lange bei Raumtemperatur verarbeitet wurden - das Arbeiten bei 4°C war wegen der hohen Harnstoffkonzentration nicht möglich - wurde mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) nach einer Verkürzung der Aufarbeitung gesucht. Es wurde das Puffersystem von der Normaldruck-Chromatographie übernommen. Die Trennung über Mono

Q-Anionenaustauscher führte in einem Schritt zu 88%iger Reinheit (nachgewiesen in der Silberfärbung Abb. 38).

pUCARG1140 (MonoQ)

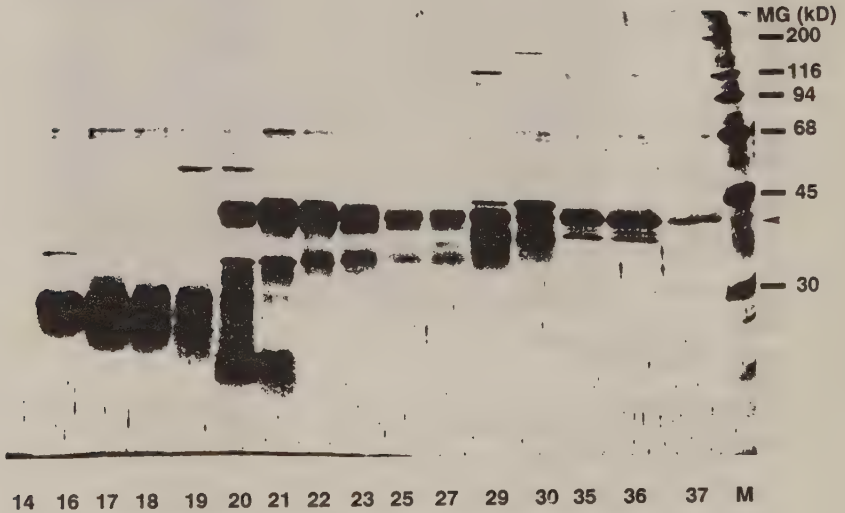


Abb. 38 Silberfärbung eines 15%igen SDS-PAGE von pUCARG1140 nach Trennung über Mono Q; die Zahlen geben die jeweilige Fraktionsnummer an; der Pfeil kennzeichnet das p138-Fragment

Für diese optimale Trennung wurde jedoch kein linearer Gradient, sondern ein Stufengradient angelegt:

0-5min.	100% A	0% B
5-15min.	100-90% A	0-10% B
15-20min.	90% A	10% B
20-30min.	90-75% A	10-25% B
30-31min.	75-0% A	25-100% B
31-40min.	0% A	100% B

Damit war die Trennung über Mono Q fast genauso effektiv wie die Trennung über die Kombination Molekularsieb/DEAE. Der Vorteil der Einstufentrennung war, daß das Protein durch die große Zeitverkürzung (40min. Trennung anstatt 2 Tage) vor Proteasen besser geschützt war und die Antigenität im hohen Maß erhalten blieb.

3.8. ELISA von pUCARG1140

Das über Mono Q gereinigte Fusionsprotein wurde als Antigen für einen ELISA eingesetzt. Das Antigen wurde in verschiedenen Konzentrationen ($0.05\mu\text{g}$ - $0.005\mu\text{g}/\text{Loch}$) bei einer Serumverdünnung von 1:50 getestet. Ebenso wurde der zweite Antikörper in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt. Als optimales System wurde dabei eine Antigenkonzentration von 0.01 - $0.03\mu\text{g}/\text{Loch}$ und eine Verdünnung des zweiten Antikörpers von 1:1000 ermittelt.

Über Immunfluoreszenzdaten der Diagnostikabteilung wurden im Institut 92 Seren gesucht und mit dem gereinigten rekombinanten Antigen getestet. Bei den Seren handelte es sich um je 23 Seren von EBV-negativen Personen, von frisch mit EBV infizierten Patienten, von Personen mit einer abgelaufenen EBV-Erkrankung und von NPC-Patienten. Die Seren wurden auf Antikörper der Klasse IgM, IgG und IgA getestet. Die Farbreaktion mit ortho-Phenylendiamin (OPD) wurde bei $\lambda=486\text{nm}$ gemessen, die Mittelwerte der optischen Dichten von den jeweiligen Serengruppen gebildet; der Faktor bezogen auf die negativen Seren berechnet und als Balkendiagramm dargestellt (Abb. 39 und 40). Das frühe Antigen p138 ist ein sehr guter Marker für das

Nasopharynxkarzinom. Die Antikörpertiter der Klasse IgG und IgA sind bei diesen Tumorpatienten signifikant erhöht.

pUCARG1140

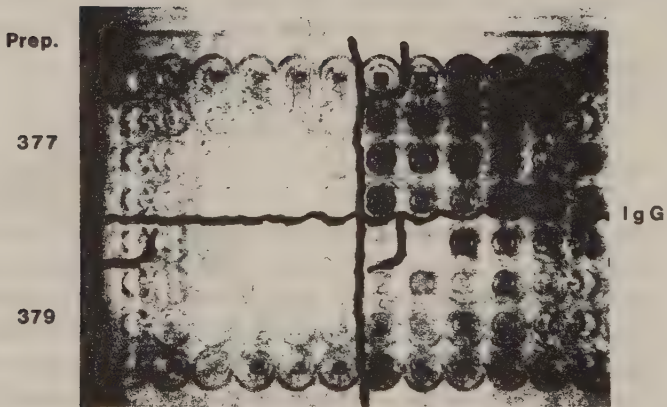


Abb. 39 ELISA von negativen Seren (linke Hälfte) und NPC-Seren (rechte Hälfte). Der Test wurde gegen Antikörper der Klasse IgG mit zweierlei Mono Q-Präparationen (obere bzw. untere Plattenhälfte) durchgeführt

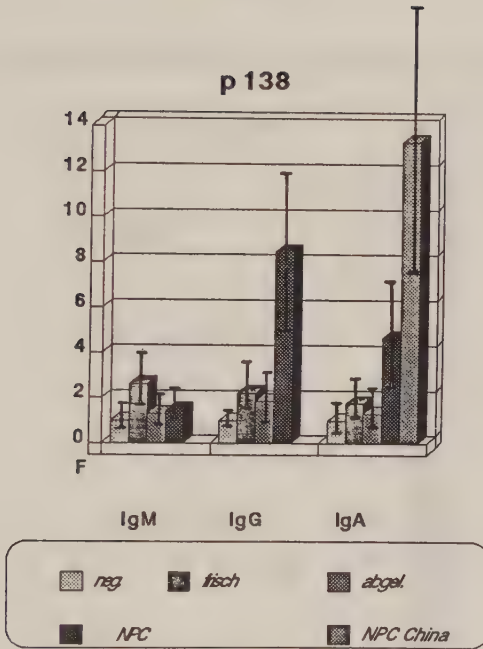


Abb. 40 Balkendiagramm der ELISAs gegen pUCARG1140. Die gemittelten OD-Werte der verschiedenen Serengruppen wurde auf den Mittelwert der negativen Seren, der $F=1$ gesetzt wurde, bezogen, zusätzlich ist die Standardabweichung miteingezeichnet.

4. Frühes Antigen p54

4.1. Lokalisation und Expression von pUC9MBcE3.2

p54 gehört zu den frühen Antigenen der Komponente D. Es wird im BamHI-M Fragment von dem Leserahmen BMRF1 kodiert (Seibl und Wolf, 1985). In vitro Translationen mit dem monoklonalen Antikörper R3 von G. Pearson gegen p54 zeigten, wie auch andere Gruppen feststellten, bei einem Vergleich mit in vivo markierten Zellextrakten, daß der

Vorläufer des p54 ein Protein mit einem Molekulargewicht von 47kD ist (Abb. 41).

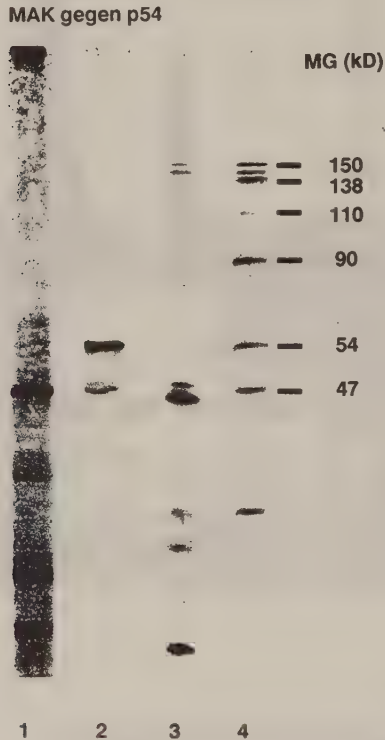


Abb. 41 *In vitro* Translation (Spur 1+3) und *in vivo* Markierung (Spur 2+4) von SI-Raji-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper R3 (Spur 1+2) und dem NPC-Pool (Spur 3+4)

In der zweidimensionalen Elektrophorese wurde deutlich, daß das p54-Protein modifiziert, d.h. in diesem Fall phosphoryliert ist (Abb. 42).

Zweidimensionale Gelelektrophorese



Abb. 42 Zweidimensionale Auftrennung einer Immunpräzipitation von SI-Raji mit NPC-Pool. Der pH-Bereich der isoelektrischen Fokussierung (1. Dimension) reichte von 3.5-9.5; die 2. Dimension war die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht im 10%igem SDS-PAGE; die Pfeile markieren das modifizierte p54-Protein

Die Konstruktion des Expressionsvektors pUC9MBcE3.2 enthält den gesamten kodierenden Bereich sowie 12 Aminosäuren am N-Terminus des pUC9-Linkers (Motz et al., 1986) (Abb. 43).

ebv47.pep ck: 9559

Chou-Fasman prediction
28-APR-1987 18:31

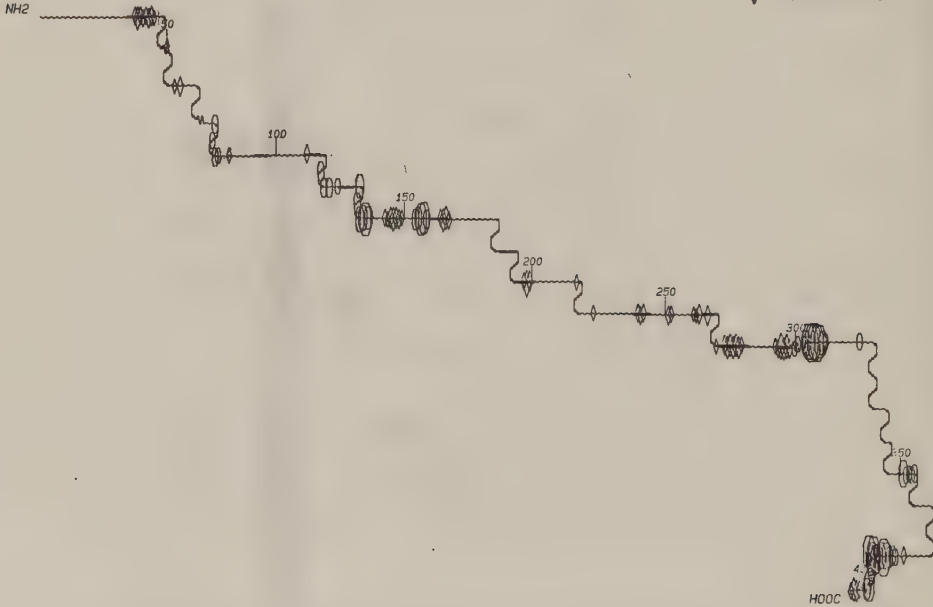
 Hydro-Philicity ≥ 0.7
 Hydro-Phobicity ≤ -0.7


Abb. 43 Computer Plot von p54; hydrophobe Bereiche sind als Rauten, hydrophile als Kreise gezeichnet; β -turns sind als Drehungen um 180° zu erkennen

Das exprimierte Protein war im Coomassie blue gefärbten Gel nur schwer zu identifizieren. Im Western Blot war die 54kD-Bande jedoch gut erkennbar (nicht gezeigt).

4.2. Reinigung über Phenylsepharose

pUC9MBcE3.2 wurde nicht wie die anderen rekombinanten Antigene in 8M Harnstoff gelöst, sondern der Bakterienextrakt wurde in Glycerin/NP40 resuspendiert und mit Lysozym in 20mM Tris pH7.5/150mM KCl/64mM EDTA lysiert. Anschließend wurde das stark DNA-bindende Protein mit 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung gefällt und mit 25% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung wieder in Lösung gebracht. Um es von der DNA zu befreien, wurde als erster Reinigungsschritt eine hydrophobe Chromatographie mit Phenyl-Sepharose CL-4B (Pharmacia) durchgeführt. Das Trennprinzip beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Protein und Gelmatrix, ohne daß ionische Effekte dazutreten. Durch die Abnahme der Polarität konnten die im Gegensatz zur DNA hydrophoberen Proteine eluiert werden. Dazu wurde ein linearer Gradient von 0-50% Ethylenglykol angelegt.

Die hydrophile DNA wurde nicht gebunden, das pUC9MBcE3.2-Protein war hydrophober als die DNA, wurde also an die Säulenmatrix gebunden und konnte erst mit 20% Ethylenglykol eluiert werden (Abb. 44).

Die Coomassie blue Färbung zeigte neben dem angereicherten p54 auch noch einige E.coli-Banden. Der überwiegende Teil der unerwünschten Proteine war jedoch schon abgetrennt. Die p54-Bande besaß 12.3% des Gesamtproteins. Im Western Blot reagierte bei den Fraktionen (17-20), die mit einer höheren Konzentration an Ethylenglykol eluiert wurden, nur mehr das p54-Protein (Abb. 45). Da dieser Reinheitsgrad für einen ELISA noch zu gering war, wurde als weiterer Trennungsschritt die Anionenaustausch-Chromatographie gewählt.

Abb. 44

Abb. 45

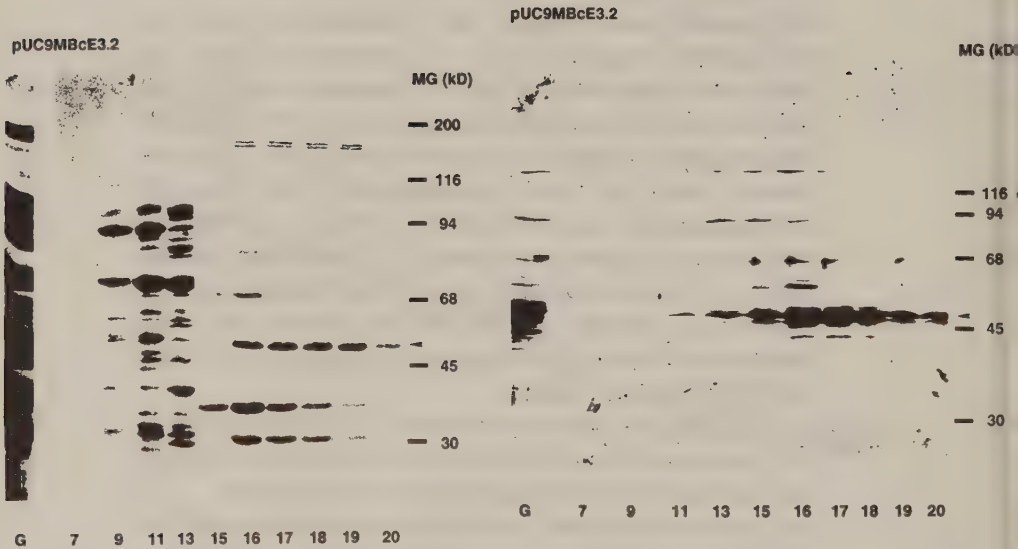


Abb. 44/45 Coomassie-blue Färbung (Abb. 44) und Western Blot (Abb. 45) eines 15%igen SDS-PAGE von pUC9MBcE3.2 nach Trennung über Phenylsepharose. G: Gesamtextrakt; alle weiteren Spuren sind mit der Fraktionsnummer bezeichnet; der Pfeil zeigt das p54-Protein an

4.3. Reinigung über Mono Q

Das von der DNA abgetrennte Protein wurde in 20mM Tris pH7.5/0.1% Triton-X100 umgepuffert und über HPLC an der Mono Q-Säule getrennt. Der lineare Gradient reichte von 0-1M NaCl. Das spezifische Protein wurde mit 0.15M NaCl von der Säule abgelöst. Die Reinheit des Produkts betrug jetzt 79.8% (Abb. 46). Der Western Blot zeigte, daß die Antigenität während der Reinigung erhalten geblieben war (Abb. 47).

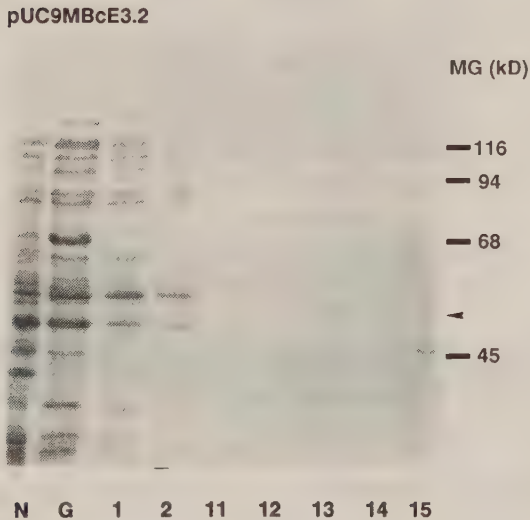


Abb. 46 Coomassie-blue Färbung eines 12.5%igen SDS-PAGE von pUC9MBcE3.2 nach Trennung über Mono Q. Spur N: Negativkontrolle pUC8; G: Gesamtextrakt; alle weiteren Spuren sind mit der Fraktionsnummer bezeichnet; der Pfeil zeigt das Protein an

pUC9MBcE3.2

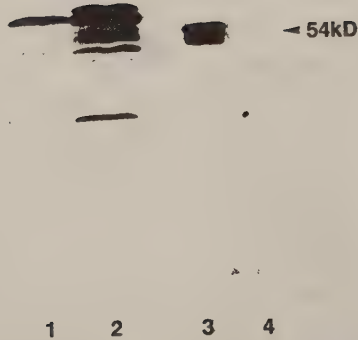


Abb. 47 Western Blot des gereinigten p54-Proteins. Spur 1: nicht induzierter Bakterienextrakt; 2: induzierter Bakterienextrakt; 3: gereinigter Extrakt; 4: Negativkontrolle pUC8

4.4. ELISA mit pUC9MBcE3.2

Der Test wurde wie bei pUCARG1140 entwickelt und etabliert. Die Antigenkonzentration betrug $0.03\mu\text{g}/\text{Loch}$, und die Seren wurden 1:50 verdünnt. Es wurden wieder 23 Seren von jeder Patientengruppe getestet (s. auch 3.8.) und die Faktoren in Relation zu den Mittelwerten der gemessenen optischen Dichten in einem Balkendiagramm aufgezeichnet

(Abb. 48). p54 kann demnach als Markerprotein gegen die Antikörper der Klasse IgM und IgG bei einer frischen Infektion und als Marker gegen Antikörper der Klasse IgA bei NPC-Patienten dienen.

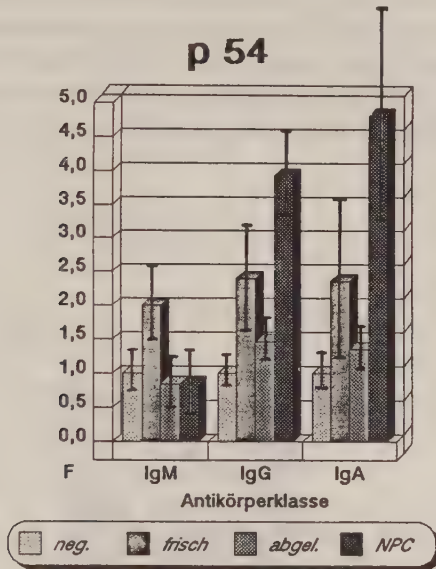


Abb. 48 Balkendiagramm des ELISAs von vier verschiedenen Serumgruppen gegen p54. Der Mittelwert der ODs der Negativseren wurde $F=1$ gesetzt, zusätzlich ist die Standardabweichung miteingezeichnet.

5. Membranproteine gp250/350

5.1. Lokalisation und Expression

Wie bereits in der Einleitung erläutert wurde, besteht die Hülle des EBV unter anderem auch aus den zwei Glykoproteinen mit dem Molekulargewicht von 250kD und 350kD (Qualtiere und Pearson, 1980;

Thorley-Lawson und Edson, 1979). Die beiden Proteine werden im BamHI-L Fragment vom Leserahmen BLLF1 kodiert. Das kleinere Protein gp250 besitzt eine verkürzte mRNA, die aber in demselben Leserahmen wie die mRNA des größeren Produkts kodiert ist. Beide Proteine haben gemeinsame antigene Determinanten, so daß ein rekombinantes Konstrukt für beide Proteine gewählt werden konnte. Der für die Reinigung benutzte Klon pUC19LP1.9 (Motz et al., 1985b) umfaßte 69.9% der Aminosäuren des gesamten Proteins (Abb. 49).

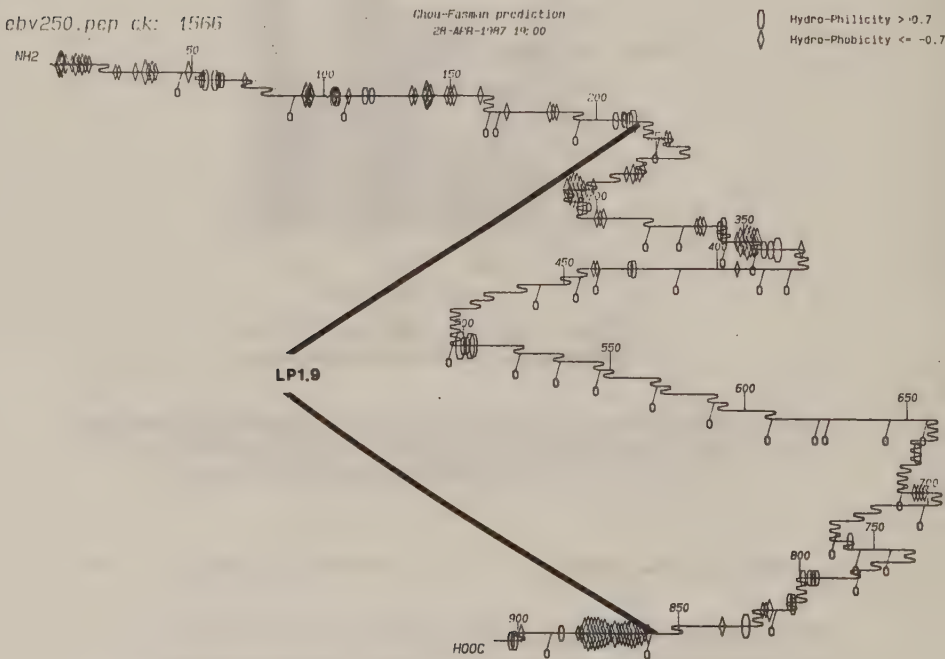


Abb. 49 Computer Plot der Membranantigene. Hydrophobe Bereiche sind als Rauten, hydrophile Bereiche als Kreise und glykosilierte Stellen mit O gezeichnet. β -turns sind als 180° Drehungen zu erkennen; mit LP1.9 ist der gp250/350-Bereich des Konstrukts pUC19LP1.9 markiert

Das Konstrukt existierte mit einer besseren Antigenität auch als β -gal-Fusionsprotein. Es wurde jedoch aus den bereits bei p150 erläuterten Gründen nicht für die Reinigung eingesetzt. pUC19LP1.9 wurde nicht sehr stark exprimiert. In der Coomassie-blue Färbung zeigte der induzierte Gesamtextrakt nur eine sehr schwache zusätzliche Bande. Nach der Lyse und dem fraktionierten Lösen in 4M und 8M Harnstoff, zeigte der im 8M Harnstoff gelöste Teil eine deutliche Anreicherung des Proteins (Abb. 50).

pUC19LP1.9



Abb. 50 Coomassie-blue Färbung eines 10%igen SDS-PAGE von gp250/350. Spur 1: nicht induzierter Bakterienextrakt; 2: induzierter Extrakt; 3: in 4M Harnstoff lösliches Lysat; 4: in 8M Harnstoff lösliches Lysat.

5.2. Reinigung über Mono Q

pUC19LP1.9 wurde induziert, lysiert und der in 4M Harnstoff unlösliche Teil in 8M Harnstoff aufgenommen. Das Protein wurde in einem linearen Salzgradienten von 0-0.5M NaCl aufgetrennt. Dabei wurde pUC19LP1.9 nicht an die Säule gebunden, sondern kam im Durchlauf. Gleichzeitig wurde eine Degradation oder unvollständige Translation des Produkts sichtbar, so daß ein Teil des Expressionsprodukts bei einem Molekulargewicht von 40kD nachgewiesen wurde (Abb. 51). Die Abtrennung von den restlichen E.coli-Proteinen erfolgte, indem diese an die Säule gebunden und erst mit Salz ab 0.15M eluiert wurden.

pUC19LP1.9

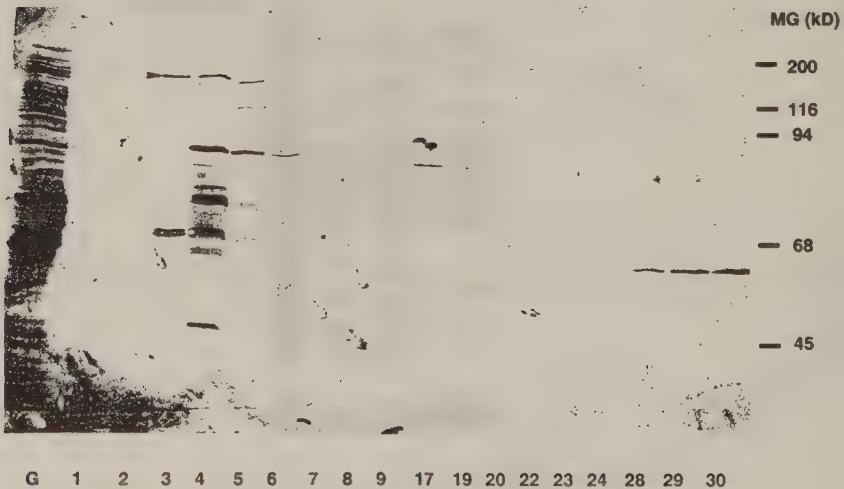


Abb. 51 Western Blot eines 10%igen SDS-PAGE mit Peroxidase-markiertem Kaninchen anti-human IgG nach Trennung über Mono Q; G=Gesamtextrakt, alle weiteren Spuren sind mit der Fraktionsnummer gekennzeichnet; der Pfeil deutet auf pUC19LP1.9 in Fraktion 3-5

5.3. ELISA mit pUC19LP1.9

Der Nachweis von Antikörpern gegen die Membranproteine wird nicht routinemäßig bei einer EBV-Infektion durchgeführt. Untersuchungen von Zhu et al., 1986, zeigten jedoch, daß die Membranantigene als Marker für ein Nasopharynxkarzinom dienen können. W. Jilg (Jilg und Wolf, 1985) konnte zeigen, daß das Fehlen von gp250/350 für die Diagnose einer chronischen EBV-Infektion von Bedeutung ist. Die bisher durchgeführten Testsysteme Immunpräzipitation und Western Blot sind nicht geeignet, größere Serien an Seren zu testen. Da jedoch bis heute eine eindeutige klinische Diagnose der chronischen EBV-Erkrankung fehlt, wurde auf eine Testung von Seren verzichtet, die von vermutlich chronischen EBV-Trägern stammten. Es wurde jedoch ein ELISA unter Verwendung von einem rekombinanten Antigen aufgebaut, um negative Seren sowie Seren von NPC-Patienten auf Antikörper der Klasse IgG und IgA zu testen. Dazu wurden wieder jeweils 23 Seren benutzt und der Mittelwert der optischen Dichte als Balkendiagramm dargestellt (Abb. 52).

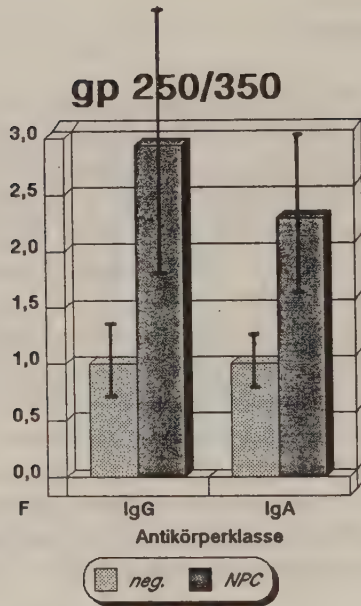


Abb. 52 Balkendiagramm der ELISAs von pUC19LP1.9 mit negativen Seren und NPC-Seren gegen Antikörper der Klasse IgG und IgA. Die Mittelwerte der ODs der negativen Seren wurden $F=1$ gesetzt, zusätzlich ist die Standardabweichung miteingezeichnet.

6. Nukleäres Antigen EBNA1

EBNA1 wurde als Fusionsprotein pUC9KTB3.8 exprimiert. Es kodiert im BamHI-K Fragment im Leserahmen BKRF1 und besitzt eine ca. 300 Aminosäuren lange Repeat-Struktur. Das klonierte Protein umfaßt 42.7% der Aminosäuren von EBNA1 von den Schnittstellen TaqI bis BamHI und schließt den C-Terminus von EBNA1 mit ein. Das Fragment wurde in pUC9 hinter den lac-Promotor kloniert (Abb. 53). Die Reinigung von EBNA1 erfolgte durch W. Jilg und I. Münz über S-Sepharose fast flow. Das gereinigte Protein wurde erfolgreich im ELISA eingesetzt (nicht gezeigt).

ebvebna1.pap ck: 8480

Chou-Fasman prediction
28-APR-1987 16:32

○ Hydro-Philicity >=0.7
◇ Hydro-Phobicity <= -0.7

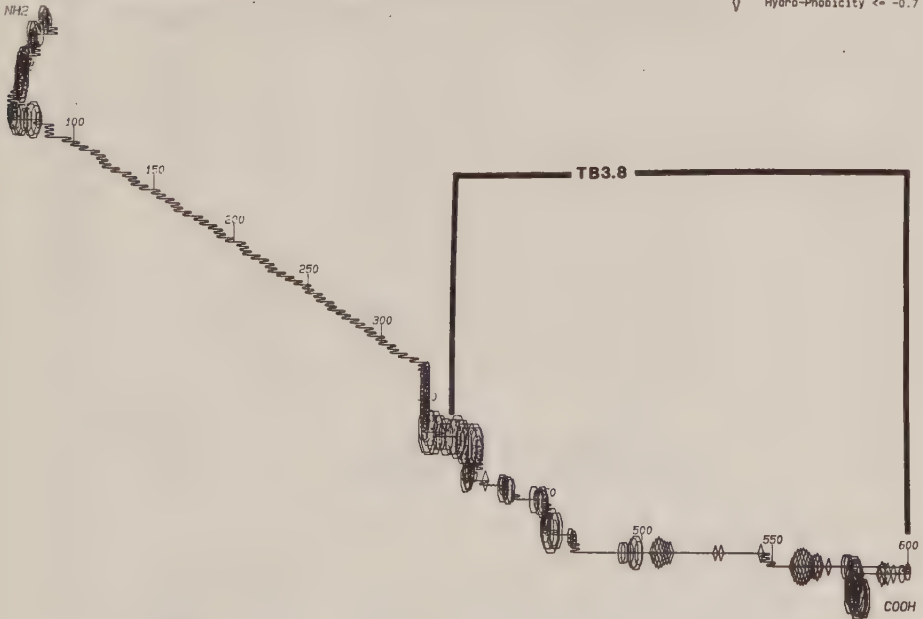


Abb. 53 Computer Plot von EBNA1; hydrophobe Bereiche sind als Rauten, hydrophile als Kreise gezeichnet, β -turns sind als 180° Drehungen zu erkennen, die glykosilierten Stellen sind mit O bezeichnet.

7. ELISA von 100⁰ menschlichen Seren (Doppelblindstudie)

Für eine Doppelblindstudie wurden von Prof. Morgenstern und Dr. Koldovsky, HNO-Klinik Düsseldorf, 100 Seren zur Verfügung gestellt. Die Seren wurden in der Immunfluoreszenz auf Antikörper gegen VCA und EA und im ELISA auf Antikörper gegen p150, p138, p54 und EBNA1 getestet. Die OD-Werte der ELISAs wurden auf den mittleren OD-Wert von 5 negativen Standardseren als $F=1$ bezogen. Werte zwischen $1.5 \leq F \leq 2.0$ wurden als schwach positiv oder grenzwertig angesehen, Werte von $F \geq 2.0$ als eindeutig positiv. Die Immunfluoreszenzen wurden in der Routinediagnostikabteilung des Instituts durchgeführt. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz und der ELISAs sind in Tabelle 3 zusammengestellt:

Zusammenfassung der serologischen Ergebnisse (IF und ELISA) der Doppelblindstudie mit der daraus resultierenden Diagnose sowie der dazugehörige klinische Befund

Nr.	Immunfluoreszenz				von der IF		ELISA										von den ELISAs		klin. Befund	
	Serumverdünnung				abgeleitete		Serumverdünnung 1:50										abgeleitete			
	(Titer 1:x)				Diagnose		(Faktor)										Diagnose			
	anti-VCA	anti-EA	anti-p150		anti-p138		anti-p54		anti-EBNA1											
	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA		
1	-	64	-	nt.	-	-	abgel.	1.3	3.6	1.9	0.5	1.2	1.6	1.2	0.7	1.4	+	abgel.		Larynx-Ca
2	-	64	-	nt.	-	-	abgel.	1.8	3.7	5.1	0.7	1.2	1.3	0.7	1.4	1.4	-	chron.		Tonsillen-Ca
3	-	32	-	nt.	-	-	abgel.	2.0	1.8	3.4	0.9	1.3	1.1	1.7	0.9	1.2	+	frisch		Stimmband-Ca
4	-	64	16	nt.	32	16	NPC	1.6	2.2	2.8	0.5	1.1	0.8	1.2	3.5	2.2	+	NPC		lymphoepithel. NPC
5	-	64	-	nt.	8	-	abgel.	1.7	7.7	2.8	0.7	2.7	1.8	1.3	0.7	0.9	+	abgel.		Larynx-Ca
6	-	256	-	nt.	-	-	abgel.	1.4	2.8	1.3	0.7	1.1	1.0	1.0	2.6	3.3	+	abgel.		Tonsillen-Ca
7	-	32	-	nt.	-	-	abgel.	0.8	4.1	0.5	0.5	2.3	1.0	0.9	1.1	0.5	+	abgel.		Zungen-Ca
8	-	128	-	nt.	-	-	abgel.	0.8	2.4	0.6	0.9	1.1	1.1	1.0	0.7	0.9	+	abgel.		Tonsillen-Ca
9	16	256	-	nt.	8	-	frisch	1.5	1.9	1.2	1.2	1.4	1.8	1.3	0.6	1.5	+	frisch (?)		Hypopharynx-Ca
10	-	16	-	nt.	-	-	abgel.	1.6	3.8	1.4	1.0	0.8	0.8	1.7	0.6	0.8	-	frisch > abgel.		Infekt. Mononukleose

Fortsetzung Tab. 3:

Nr.	Immunfluoreszenz						von der IF		ELISA								von den ELISAs		klin. Befund
	Serumverdünnung						abgeleitete		Serumverdünnung 1:50								abgeleitete		
	(Titer 1:x)						Diagnose		(Faktor)								Diagnose		
	anti-VCA			anti-EA			anti-p150		anti-p138		anti-p54		anti-EBNA1						
	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	EBNA1			
11	-	256	8	nt.	16	-	1.6	5.8	1.5	0.8	12.1	0.9	1.4	3.5	0.4	+	abgel.	Mundboden-Ca	
12	-	32	-	nt.	-	-	0.9	<u>2.7</u>	0.9	0.9	0.7	0.5	0.8	0.6	0.5	-	chron.	NPC-Plattenepithel	
13	-	64	-	nt.	-	-	1.4	3.7	2.2	0	1.0	0.6	0.5	1.2	0.8	+	abgel.	Adeno-Ca	
14	-	64	-	nt.	8	-	1.0	2.9	4.1	0.1	2.1	0.7	0.7	1.3	1.2	+	abgel.	Mundboden-Ca	
15	-	<u>128</u>	<u>64</u>	nt.	<u>16</u>	<u>8</u>	1.9	<u>6.4</u>	<u>4.0</u>	0.9	<u>2.3</u>	<u>4.4</u>	1.2	<u>5.1</u>	1.3	+	<u>NPC</u>	lymphoepith. NPC	
16	-	16	-	nt.	-	-	0.9	<u>1.9</u>	2.5	0.8	0.8	1.9	0.8	0.9	2.3	-	chron.	Mundboden-Ca	
17	-	32	-	nt.	-	-	1.2	<u>3.2</u>	6.0	0.5	5.1	2.9	0.7	2.5	3.2	-	chron.	Tonsillen-Ca	
18	-	8	-	nt.	-	-	1.5	<u>13.6</u>	<u>9.2</u>	0	0.9	0.8	1.5	1.2	1.3	+	abgel.(NPC?)	Sarkom	
19	-	16	-	nt.	-	-	1.9	4.2	0.8	1.0	1.0	0.7	1.7	0.9	0.9	+	abgel.	Larynx-Ca	
20	-	32	-	nt.	-	-	1.7	5.7	1.5	0.5	0.6	0.2	1.0	0.8	0.5	+	abgel.	Mundboden-Ca	

Fortsetzung Tab. 3:

Nr.	Immunfluoreszenz				von der IF		ELISA										von den ELISAs		klin. Befund	
	Serumverdünnung				abgeleitete		Serumverdünnung 1:50										abgeleitete			
	(Titer 1:x)				Diagnose		(Faktor)										Diagnose			
	anti-VCA		anti-EA				anti-p150					anti-p138					anti-p54			
	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	EBNA1	
A	21	-	16	-	nt.	-	-	abgel.	1.9	3.1	1.3	0.7	0.8	0.3	0.8	0.6	0.5	+	abgel.	lymphoepith. NPC (?)
	22	-	us.	-	nt.	us.	-	?	1.8	6.5	2.4	0.3	1.3	0.7	0.6	0.9	0.9	+	abgel.	lymphoepith. NPC (?)
	23	-	us.	-	nt.	us.	-	?	1.9	6.8	2.6	0.3	1.1	0.8	0.4	1.0	1.1	+	abgel.	lymphoepith. NPC (?)
	24	-	us.	-	nt.	us.	-	?	1.8	4.5	3.0	0.4	1.5	0.8	0.6	1.0	0.8	+	abgel.	lymphoepith. NPC (?)
	25	-	32	-	nt.	8	-	abgel.	1.7	5.2	2.3	0.6	1.3	1.0	1.0	0.9	1.1	+	abgel.	lymphoepith. NPC (?)
B	26	-	16	-	nt.	-	-	abgel.	0.7	1.7	1.1	0.5	0.7	0.3	0.7	1.6	0.7	+	abgel.	Gaumen-Ca
	27	-	16	-	nt.	-	-	abgel.	1.9	<u>4.6</u>	<u>10.6</u>	0.2	0.9	0.5	0.8	1.3	0.7	+	abgel.(NPC?)	lymphoepith. NPC
	28	-	16	-	nt.	-	-	abgel.	1.8	<u>4.5</u>	<u>9.2</u>	0.5	1.0	0.6	1.0	1.3	0.7	+	abgel.(NPC?)	lymphoepith. NPC
	29	-	8	-	nt.	-	-	abgel.	1.7	<u>8.9</u>	<u>10.1</u>	1.2	1.4	0.8	1.0	1.8	0.7	+	abgel.(NPC?)	lymphoepith. NPC
	30	-	16	-	nt.	-	-	abgel.	1.8	<u>6.2</u>	<u>9.1</u>	0.8	1.2	0.5	0.9	1.4	0.6	+	abgel.(NPC?)	lymphoepith. NPC

Fortsetzung Tab. 3:

Nr.	Immunfluoreszenz						von der IF		ELISA										von den ELISAs		klin. Befund
	Serumverdünnung						abgeleitete		Serumverdünnung 1:50										abgeleitete		
	(Titer 1:x)						Diagnose		(Faktor)										Diagnose		
	anti-VCA		anti-EA						anti-p150		anti-p138		anti-p54		anti-EBNA1						
	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	EBNA1		
B ₃₁	-	16	-	nt.	-	-	abgel.	1.4	5.3	7.1	0.2	0.9	0.4	0.5	1.3	0.6	+	abgel.		lymphoepith. NPC	
	-	16	-	nt.	-	-	abgel.	1.0	3.9	0.7	0	0.7	0.6	0.1	1.2	1.2	+	abgel.		Larynx-Ca	
	-	16	-	nt.	-	-	abgel.	1.7	3.0	0.9	1.5	2.7	0.6	1.3	0.6	0.5	+	abgel.		Larynx-Ca	
	-	64	-	nt.	-	-	abgel.	1.9	8.9	3.4	1.3	1.0	1.2	1.8	0.5	1.5	-	chron.		Weichgaumen-Ca	
	-	8	-	nt.	-	-	abgel.	1.7	7.4	0.6	0	0.9	0.4	0	0.6	0.4	+	abgel.		Larynx-Ca	
36	-	16	-	nt.	-	-	abgel.	1.1	3.1	1.5	0.8	0.9	0.4	1.6	1.3	0.6	+	abgel.		Hypopharynx-Ca	
37a	-	64	-	nt.	-	-	abgel.	0.5	4.0	3.5	0.6	0.7	1.0	1.2	1.7	1.7	+	abgel.		Larynx-Ca	
37b	-	64	-	nt.	8	-	abgel.	0.8	5.4	1.7	0	8.5	0.6	0.3	2.5	0.9	+	abgel.		Larynx-Ca	
38	-	32	-	nt.	8	-	abgel.	1.8	7.3	5.0	1.4	4.0	1.3	1.8	1.6	1.4	+	abgel.		Supraglottis-Ca	
39	-	32	-	nt.	8	-	abgel.	1.7	2.9	1.8	0.3	0.9	0.4	1.6	1.7	0.6	-	chron.		Mundboden-Ca	
40	-	16	-	nt.	-	-	abgel.	1.0	<u>6.3</u>	<u>2.6</u>	0.2	0.8	0.2	0.8	<u>2.6</u>	0.5	+	abgel.(NPC?)		Larynx-Ca	

Fortsetzung Tab. 3:

Nr.	Immunfluoreszenz				von der IF		ELISA										von den ELISAs		klin. Befund
	Serumverdünnung				abgeleitete		Serumverdünnung 1:50										abgeleitete		
	(Titer 1:x)				Diagnose		(Faktor)										Diagnose		
	anti-VCA		anti-EA		anti-p150		anti-p138		anti-p54		anti-EBNA1								
	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	EBNA1			
C	41	-	512	8	nt.	8	-	abgel.	1.5	2.6	0.7	0.2	1.1	0.3	0.7	3.3	0.6	+	lymphoepith. NPC
	42	-	256	8	nt.	-	8	abgel.	1.9	2.5	0.5	0.3	0.9	0.3	0.9	3.2	0.5	+	lymphoepith. NPC
	43	-	256	8	nt.	8	-	abgel.	1.3	2.6	0.6	0.1	0.9	0.2	0.5	3.3	0.6	+	lymphoepith. NPC
	44	-	64	8	nt.	8	-	abgel.	1.4	2.9	0.8	0.4	1.2	0.6	1.0	2.9	0.7	+	lymphoepith. NPC
	45	-	64	-	nt.	-	-	abgel.	1.7	<u>10.2</u>	<u>2.7</u>	1.2	0.8	1.2	1.2	0.6	0.8	+	abgel.(NPC?) Larynx-Ca
D	46	-	64	16	nt.	-	8	abgel.	<u>1.2</u>	<u>0.8</u>	1.9	<u>0.8</u>	<u>1.1</u>	0.5	<u>1.3</u>	<u>0.7</u>	1.1	+	neg. (?) Plattenepithel-NPC
	47	-	64	16	nt.	8	8	abgel.	1.3	3.2	3.0	0.4	1.0	0.3	1.2	0.7	1.0	+	abgel. Plattenepithel-NPC
	48	-	64	32	nt.	-	8	abgel.	1.2	2.9	3.2	0.1	0.8	0.3	1.4	0.8	1.1	+	abgel. Plattenepithel-NPC
	49	-	128	32	nt.	-	8	abgel.	1.2	2.8	3.1	0.1	1.0	0.3	1.4	0.7	0.9	+	abgel. Plattenepithel-NPC
	50	-	256	-	nt.	32	-	abgel.	1.5	1.5	1.0	0.3	3.1	0.3	0.4	1.3	0.2	+	abgel. Burkitt's Lymphom

Fortsetzung Tab. 3:

Nr.	Immunfluoreszenz						von der IF		ELISA										von den ELISAs		klin. Befund
	Serumverdünnung						abgeleitete		Serumverdünnung 1:50										abgeleitete		
	(Titer 1:x)						Diagnose		(Faktor)										Diagnose		
	anti-VCA		anti-EA						anti-p150		anti-p138		anti-p54		anti-EBNA1						
	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgM	IgG	IgA	EBNA1				
E	51	-	128	16	nt.	32	16	NPC	0.4	0.9	0.2	0	0.6	0.2	0.4	2.5	1.4	+	?	lymphoeiph. NPC	
	52	-	64	16	nt.	32	16	NPC	0.9	1.6	2.4	0.1	0.5	0.1	0.2	2.6	1.6	-	chron.	lymphoeiph. NPC	
	53	-	64	-	nt.	32	16	NPC	0.3	0.8	0.2	0	0.5	0.2	0.4	2.9	1.5	+	?	lymphoeiph. NPC	
	54	-	64	-	nt.	32	16	NPC	0.6	0.6	0.2	0.1	0.6	0.2	0.3	2.8	1.4	+	?	lymphoeiph. NPC	
	55	-	64	-	nt.	-	-	abgel.	1.0	13.4	2.6	1.7	1.8	1.0	1.4	1.0	1.0	+	abgel.(NPC?)	Larynx-Ca	
F	56	-	128	8	nt.	32	32	NPC	1.6	3.3	0.5	0	1.0	2.1	0.3	1.1	0.3	+	NPC	lymphoeiph. NPC	
	57	-	128	8	nt.	16	16	NPC	1.4	3.4	0.5	0	1.1	2.0	0.3	1.0	0.3	+	NPC	lymphoeiph. NPC	
	58	-	256	32	nt.	32	32	NPC	0.7	(1.3)	0.4	0.4	1.2	2.0	0.5	1.0	0.4	+	NPC	lymphoeiph. NPC	
	59	-	128	8	nt.	32	16	NPC	1.7	3.2	0.7	0	1.2	2.7	0.3	0.9	0.3	+	NPC	lymphoeiph. NPC	
	60	-	64	-	nt.	-	-	abgel.	0.4	4.4	2.3	0.7	1.1	0.7	0.2	0.7	0.7	+	abgel.	Mundboden-Ca	

Fortsetzung Tab. 3:

Nr.	Immunfluoreszenz						von der IF		ELISA										von den ELISAs		klin. Befund
	Serumverdünnung						abgeleitete		Serumverdünnung 1:50										abgeleitete		
	(Titer 1:x)						Diagnose		(Faktor)										Diagnose		
	anti-VCA		anti-EA		IgG		IgA		anti-p150		anti-p138		anti-p54		anti-EBNA1						
	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA			
61	-	64	-	nt.	-	-	1.1	3.0	0.9	0	2.0	1.1	0.5	1.0	0.9	+			Stimmband-Ca		
62	-	64	-	nt.	-	-	1.3	4.8	1.2	0.7	5.9	0.2	0.9	1.5	0.4	+			Stimmband-Ca		
63	-	16	8	nt.	-	-	0.5	3.3	1.5	0	1.8	1.1	0.7	1.5	1.7	+			Leukoplakie		
64	-	64	-	nt.	-	-	<u>2.0</u>	<u>4.4</u>	2.9	0.1	0.8	0.5	1.2	1.2	0.6	<u>+</u>		frisch < abgel.	Oberkiefer-Ca		
65	-	16	-	nt.	-	-	1.8	<u>10.3</u>	<u>2.0</u>	0.5	1.2	1.5	0.7	1.0	1.0	+		abgel.(NPC?)	lymphoepith. NPC		
G	66	-	16	-	nt.	-	1.8	<u>10.4</u>	<u>2.1</u>	0.7	1.0	1.4	1.0	1.2	1.2	+		abgel.(NPC?)	lymphoepith. NPC		
	67	-	16	-	nt.	-	1.9	<u>10.8</u>	<u>2.1</u>	0.9	1.2	1.6	1.0	1.2	1.2	+		abgel.(NPC?)	lymphoepith. NPC		
	68	-	16	-	nt.	-	1.7	<u>10.3</u>	<u>1.9</u>	1.5	1.8	1.6	1.1	1.5	1.1	+		abgel.(NPC?)	lymphoepith. NPC		
69	-	16	-	nt.	-	-	<u>1.6</u>	5.0	1.3	0.7	1.7	0.6	1.6	6.1	1.0	+		abgel.	Lymphom		
H	70	-	16	-	nt.	-	1.8	4.7	1.1	0.3	1.3	0.4	1.2	4.7	0.9	+		abgel.	Lymphom		

Fortsetzung Tab. 3:

Nr.	Immunfluoreszenz				von der IF				ELISA										von den ELISAs		klin. Befund
	Serumverdünnung				abgeleitete				Serumverdünnung 1:50										abgeleitete		
	(Titer 1:x)				Diagnose				(Faktor)										Diagnose		
	anti-VCA		anti-EA		anti-p150		anti-p138		anti-p54		anti-EBNA1										
	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	EBNA1					
H ₁	71	-	16	-	nt.	-	-	abgel.	1.9	5.3	1.2	0.2	1.4	0.3	1.2	4.8	1.2	+	abgel.	Lymphom	
	72	-	32	-	nt.	-	-	abgel.	1.5	5.3	1.3	0.5	1.3	0.4	1.5	5.3	1.1	+	abgel.	Lymphom	
	73	-	256	-	nt.	-	-	abgel.	1.2	9.0	1.8	0.7	1.4	0.7	1.6	1.2	1.4	+	abgel.	Larynx-Ca	
	74	-	256	-	nt.	-	-	abgel.	0.6	<u>4.6</u>	1.1	0	1.3	1.1	0.2	0.6	0.9	-	<u>chron.</u>	Kehlkopf-Ca	
	75	-	128	-	nt.	16	-	abgel.	1.7	3.5	0.3	0.3	0.7	0.4	0.4	0.5	0.3	+	abgel.	Non-Hodgkin-Lymphom	
76	-	512	-	nt.	8	-	-	abgel.	0.2	2.4	0.8	0.2	0.6	0.7	0.2	0.5	0.6	+	abgel.	Rachen-Ca	
77	-	64	-	nt.	-	-	-	abgel.	0.3	<u>2.8</u>	1.0	0.3	0.5	0.7	0.3	0.5	0.4	-	<u>chron.</u>	Plattenepithel-Ca	
78	-	32	8	nt.	-	-	-	abgel.	0.3	2.8	1.4	0.2	0.5	0.6	0.2	0.4	0.4	+	abgel.	Plattenepithel-Ca	
79	-	32	-	nt.	8	-	-	abgel.	0.3	<u>3.3</u>	1.0	1.1	0.7	1.7	0.3	0.5	0.5	-	<u>chron.</u>	Plattenepithel-Ca	
80	-	32	-	nt.	8	-	-	abgel.	1.3	3.6	1.8	1.9	3.3	2.0	0.9	3.7	0.7	-	?	Non-Hodgkin-Lymphom	

Fortsetzung Tab. 3:

Nr.	Immunfluoreszenz				von der IF		ELISA										von den ELISAs		klin. Befund	
	Serumverdünnung				abgeleitete		Serumverdünnung 1:50										abgeleitete			
	(Titer 1:x)				Diagnose		(Faktor)										Diagnose			
	anti-VCA		anti-EA		anti-p150		anti-p138		anti-p54		anti-EBNA1									
	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgA	EBNA1						
81	-	128	-	nt.	128	-	abgel.	1.0	2.4	0.4	1.4	1.1	0.5	0.9	0.8	0.6	+	abgel.		Mund-Ca
82	-	64	-	nt.	8	-	abgel.	1.2	8.1	0.6	0.9	6.3	0.6	1.1	1.6	0.5	+	abgel.		Leukoplakie
83	-	1024	8	nt.	-	-	abgel.	1.0	4.1	0.8	0.7	0.8	0.7	0.6	1.3	0.7	+	abgel.		Zungen-Ca
84	-	128	-	nt.	-	-	abgel.	1.7	7.6	3.6	0.4	0.8	1.3	0.3	0.7	1.0	+	abgel.		Zungen-Ca
85	-	64	-	nt.	8	-	abgel.	1.8	2.7	1.5	1.0	1.3	0.7	0.9	0.6	0.6	+	abgel.		Epiglottis-Ca
86	-	16	8	nt.	-	-	abgel.	1.7	1.2	0.9	1.7	1.4	0.5	1.2	6.7	1.0	+	abgel.		Non-Hodgkin-Lymphom
87	-	8	8	nt.	8	-	abgel.	1.2	7.5	0.7	1.4	6.7	0.6	0.9	1.5	0.5	+	abgel.		Leukoplakie
88	-	16	-	nt.	16	-	abgel.	1.0	<u>1.6</u>	0.6	1.1	1.1	0.6	0.6	0.8	0.5	+	<u>neg.</u> (?)		Mund-Ca
89	-	16	-	nt.	16	-	abgel.	1.0	<u>1.5</u>	0.5	0.8	1.0	0.8	0.7	0.8	0.7	+	<u>neg.</u> (?)		Mund-Ca
90	-	16	-	nt.	-	-	abgel.	1.6	2.5	1.7	0.7	1.0	0.8	0.6	3.2	0.7	+	abgel.		lymphoepith. NPC

Fortsetzung Tab. 3:

Nr.	Immunfluoreszenz						von der IF		ELISA										von den ELISAs abgeleitete Diagnose	klin. Befund
	Serumverdünnung						abgeleitete		Serumverdünnung 1:50											
	(Titer 1:x)						Diagnose		(Faktor)											
	anti-VCA		anti-EA						anti-p150		anti-p138		anti-p54		anti-					
	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	EBNA1				
91 92 93 94 95	-	16	-	nt.	-	-	1.9	<u>2.6</u>	<u>2.5</u>	1.2	1.0	0.6	1.0	<u>3.4</u>	0.6	+	abgel.(NPC?)	lymphoepith. NPC		
	-	16	-	nt.	-	-	1.7	<u>2.7</u>	<u>2.4</u>	0.9	1.0	0.4	0.8	<u>3.4</u>	0.5	+	abgel.(NPC?)	lymphoepith. NPC		
	-	8	-	nt.	-	-	1.9	<u>3.2</u>	<u>2.3</u>	0.8	0.9	0.5	1.0	<u>4.2</u>	0.6	+	abgel.(NPC?)	lymphoepith. NPC		
	-	16	-	nt.	-	-	1.8	3.3	2.6	0.5	0.8	0.8	0.7	0.5	0.6	+	abgel.	Epiglottis-Ca		
	-	16	-	nt.	-	-	1.7	1.8	1.0	1.0	2.0	0.9	0.4	0.7	0.7	+	abgel.	Non-Hodgkin-Lymphom		
96	-	64	-	nt.	-	-	0.4	3.8	3.9	0.3	0.8	1.2	0.2	0.3	0.8	+	abgel.	Mundboden-Ca		
97	-	16	-	nt.	-	-	1.1	7.1	2.3	1.6	1.6	0.7	0.7	1.1	0.7	+	abgel.	Epiglottis-Ca		
98	-	1024	-	nt.	128	-	1.0	2.5	0.8	1.4	6.9	0.8	0.6	1.7	0.8	+	abgel.	NPC(?)		
99	-	64	-	nt.	8	-	1.6	<u>3.1</u>	1.1	1.8	1.8	1.0	1.4	0.7	0.8	-	chron.	Plattenepithel-NPC		
100	-	256	-	nt.	-	-	<u>1.4</u>	<u>1.7</u>	1.3	1.5	1.0	1.1	0.9	0.6	0.8	-	neg.	Plattenepithel-NPC		

Tab. 3

Fett gedruckte Werte sind Werte nach Absorption mit *Staph. aureus*, schräg gedruckte, unterstrichene Werte waren ausschlaggebend für die Diagnosesstellung. Seren eines Patienten aus einer Abnahme wurden zusätzlich zur Nummer mit Großbuchstaben versehen. Abk.: nt. = nicht getestet, Ca = Karzinom, abgel. = abgelaufene EBV-Infektion, chron. = chronisch aktive EBV-Infektion, lymphoepithel. NPC = lymphoepitheloides NPC, klin. = klinischer, Nr. = Serumnnummer, alle weiteren Abkürzungen wurden wie in den vorhergehenden Abbildungen und Tabellen verwendet

Erste Tests auf VCA- und EA-spezifische IgM-Antikörper zeigten vor allem im VCA-Test eine unerwartet hohe Zahl positiver Ergebnisse. Ein Vergleich der beiden Analysenmethoden zeigte, daß im ELISA der Nachweis von IgM-Antikörpern gegen p150 (VCA) häufiger positiv war als in der Immunfluoreszenz (nicht gezeigt). Tests auf IgM-Antikörper gegen EA konnten in der Immunfluoreszenz nicht durchgeführt und somit nicht verglichen werden. Im ELISA ergaben Seren mit einem positiven Signal beim Nachweis von IgM-Antikörpern gegen EA meist auch positive Werte beim Test von IgM-Antikörpern gegen VCA. IgM-Antikörper gegen VCA waren jedoch nicht immer an das Auftreten von IgM-Antikörper gegen EA geknüpft. Da IgM-Tests auch in anderen Testsystemen leicht falsch positive Ergebnisse zeigen, wurde die Spezifität des Nachweises der IgM-Antikörper geprüft. Um eventuell störende Einflüsse durch den hohen Überschuß an IgG-Antikörpern zu verhindern, wurden die positiv reagierenden Seren nach Behandlung mit Protein A aus *Staph. aureus* nochmals getestet. Bis auf zwei Seren (Serum 3 und 64) zeigten die Seren im ELISA nach Absorption mit Protein A keine Reaktion mehr. Analog dazu wurden auch die in der Immunfluoreszenz positiven IgM-Seren behandelt. Auch sie reagierten bis auf ein Serum nach Absorption nicht mehr. Da durch die Entfernung der IgG-Antikörper mit *Staph. aureus* auch die IgM-Reaktivität verschwand, war gezeigt, daß unspezifisch reagierende IgM-Antikörper, die sich an IgG-Antikörper binden können, wie z.B. Rheumafaktoren, in den ersten Testserien zu falsch positiven Werten geführt hatten.

In 2 Fällen (Serum E und Serum 86) wurden keine anti-p150-IgG-Antikörper gefunden. Allerdings zeigten diese Seren IgG-Antikörper gegen p54 und besaßen Antikörper gegen EBNA1. Da dieser Befund äußerst ungewöhnlich war, wurden diese Seren sowie Seren mit einer positiven IgG-Reaktion gegen p150 als Kontrolle auf ihren Gesamtimmunglobulingehalt über Nephelometrie getestet. Die Vermutung, daß die Immunglobuline beim Transport Schaden genommen hatten oder daß die Seren nicht korrekt gewonnen worden waren, konnte nicht bestätigt werden, da der Gehalt an Immunglobulin M, G und A jeweils im Normbereich lag. Allerdings war der Immunglobulingehalt des Serums E an der unteren Grenze der Normalwerte (nicht gezeigt).

Antikörper der IgA-Klasse gegen VCA wurden im ELISA wesentlich häufiger als in der Immunfluoreszenz nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß im ELISA Kompetitionseffekte um die Antigenbindung durch die höhere Antigenmenge weniger ausgeprägt sein dürften. Übereinstimmung zwischen der Immunfluoreszenz und dem ELISA wurde bei den IgA-Antikörpern gegen p138 erzielt. Eine Ausnahme bildete hier das Serum E. Anti-EA-IgA-Titer von 1:8 werden in der Diagnostik nicht als signifikant positiv angesehen. Die Seren 15 und F mit IgA-Antikörpern gegen p138 besaßen keine IgA-Antikörper gegen p54. Die Seren 17 und 80 zeigten nicht die übliche EBV-Serologie. Es waren IgG- und IgA-Antikörper vorhanden, jedoch keine Antikörper gegen EBNA1. Das gleichzeitige Auftreten von IgG-Antikörpern gegen p54 und p138 und von IgA-Antikörpern gegen p150 und p138 im Serum 15 ließ ein NPC vermuten. Bei NPC-Patienten werden IgG- und IgA-Antikörper gegen EA im allgemeinen auch in der Immunpräzipitation gefunden (Abb. 6).

Für die IgG-Antikörper wurde eine Korrelation zwischen den positiven Ergebnissen in der Immunfluoreszenz und im ELISA versucht. Bei 14 Patienten konnten parallel in der Immunfluoreszenz und im ELISA IgG-Antikörper gegen EA bzw. p54 und p138 nachgewiesen werden. In je 11 Fällen konnten entweder nur IgG-Antikörper gegen EA in der Immunfluoreszenz gefunden werden oder nur IgG-Antikörper gegen p54 bzw. p138 im ELISA. Von 13 Seren, die IgG-Antikörper gegen p54 im ELISA hatten, waren 7 (=54%) auch in der Immunfluoreszenz positiv. Dagegen zeigten von 17 Seren, die IgG-Antikörper gegen p138 im ELISA hatten, 11 (=65%) in der Immunfluoreszenz ein positives Signal.

8. Auswertung der Doppelblindstudie

Für die Analyse der serologischen Ergebnisse der Doppelblindstudie wurden folgende Parameter zugrunde gelegt:

Patienten mit einer frischen EBV-Infektion enthalten in der Regel keine Antikörper gegen EBNA1 und besitzen IgM- und IgG-Antikörper gegen p150 bzw. IgM-Antikörper gegen EA.

Personen mit einer abgelaufenen EBV-Infektion besitzen IgG-Antikörper gegen p150, sind anti-EBNA1 positiv und haben normalerweise keine Antikörper gegen EA.

Patienten mit einer chronischen EBV-Infektion reagieren, soweit bis jetzt eine klinische bzw. serologische Diagnose gestellt werden kann, mit p150 und EA und sind anti-EBNA1 und/oder anti-MA negativ.

NPC-Patienten besitzen oft erhöhte Titer der IgG- und IgA-Antikörper gegen p138, p54, p150 und MA. Sie besitzen ebenfalls IgG-Antikörper gegen EBNA1.

Die Seren wurden nach den genannten Kriterien den Kategorien negativ, frische Infektion, abgelaufene Infektion, chronisch aktive Infektion oder NPC zugeordnet. Eine Korrelation der Ergebnisse der Immunfluoreszenz und des ELISAs mit den histologischen Befunden ist aus Tabelle 3 ersichtlich.

Die Zuordnung der Seren in die Kategorie "chronisch" ist anhand der Immunfluoreszenzdaten nicht möglich, da wegen der nur im beschränkten Volumen vorhandenen Seren kein EBNA-Test durchgeführt worden ist. Die Seren werden daher bei Abwesenheit von IgM- und IgA-Antikörpern gegen VCA und EA der "abgelaufenen EBV-Infektion" zugeordnet.

Ein Vergleich mit der Histologie, die in Düsseldorf durchgeführt worden war, ergab keine falsch positiven Ergebnisse in der Serologie. In vier Fällen waren die Seren aufgrund ihrer hohen IgG-Werte gegen p150 NPC-verdächtig, was im histologischen Befund jedoch nicht bestätigt wurde. Alle Seren, die IgA-Antikörper gegen p138 besaßen und anti-EBNA1 positiv waren, waren nach serologischer Diagnose wie auch nach histologischem Befund lymphoepitheloide NPCs. Die Seren 17 (Tonsillen-Ca) und 80 (Non-Hodgkin-Lymphom) zeigten zwar ebenfalls positive Werte im anti-p138-IgA, sie waren jedoch anti-EBNA1 negativ, was einen Verdacht auf ein EBV-korreliertes NPC ausschloß. Auffallend häufig fehlten bei sonst unauffälliger EBV-Serologie IgG-Antikörper gegen EBNA1 bei den Plattenepithel-NPCs (in 5 von 7 Fällen). Sie wurden wegen der fehlenden anti-EBNA1-Antikörper im ELISA als "chronisch aktive EBV-Infektion" eingestuft. Hoch positive Werte bei den IgG-Antikörpern ($F > 10$) bzw. IgA-Antikörpern ($F > 9$) gegen p150 im ELISA wurden in 2 von 9 Fällen eines

lymphoepitheloiden NPCs und in 3 von 60 Fällen aller anderen Karzinoma gefunden. Ein gleichzeitiges Auftreten von IgG- und IgA-Antikörpern gegen p150 sowie von IgG-Antikörpern gegen p54 war bei einem Drittel der lymphoepitheloiden NPC-Fälle zu beobachten, jedoch nur bei 2 von 60 anderen Karzinom-Patienten.

Eine Zusammenfassung der in der Immunfluoreszenz und im ELISA positiven Fälle im Verhältnis zur Gesamtzahl zeigt Tabelle 4. Die Daten sind nach dem klinischen Befund in lymphoepitheloide NPCs, Plattenepithel-NPCs und alle anderen Karzinome aufgeschlüsselt.

	Lymphoepith. NPC		Plattenepithel-NPC		übrige Karzinoma	
	IF	ELISA	IF	ELISA	IF	ELISA
anti-p150 IgG	9/9 (100%)	8/9 (89%)	7/7 (100%)	6/7 (86%)	53/53 (100%)	43/53 (81%)
anti-p138 IgG	-	1/9 (11%)	-	0/7 (-)	-	16/53 (30%)
anti-p54 IgG	-	5/9 (56%)	-	0/7 (-)	-	8/53 (15%)
anti-EA IgG	5/9 (56%)	-	3/7 (43%)	-	18/53 (34%)	-
anti-EBNA1 IgG	n.t.	9/9 (100%)	n.t.	2/7 (29%)	n.t.	46/53 (87%)
anti-p150 IgA	5/9 (56%)	6/9 (67%)	2/7 (29%)	1/7 (14%)	5/53 (9%)	20/53 (38%)
anti-p138 IgA	-	2/9 (22%)	-	0/7 (-)	-	2/53 (4%)
anti-p54 IgA	-	1/9 (11%)	-	0/7 (-)	-	3/53 (6%)
anti-EA IgA	4/9 (44%)	-	1/7 (14%)	-	0/53 (-)	-

Tab. 4 Anzahl der positiven Werte/Anzahl aller Werte aufgeführt nach den histologischen Befunden; in der IF sind die Fälle unter anti-EA IgG bzw. IgA, im ELISA unter anti-p138 und anti-p54 IgG bzw. IgA aufgeführt. Abk.: n.t. = nicht getestet

F. Diskussion

Die Untersuchung auf Epstein-Barr Virus-Erkrankungen erfolgt bis heute über die indirekte Immunfluoreszenz. Es wird dabei nicht zwischen bestimmten Proteinen unterschieden, sondern nur zwischen den Antigenklassen VCA, EA und EBNA. Das System beruht auf der Fixierung von BJA-B- (neg. Kontrolle), Raji- (EBNA), induzierten Raji- (EA) und P3HR1-Zellen (VCA) auf Objektträgern, sowie deren Auswertung im Fluoreszenzmikroskop. Dieses arbeitsintensive und teure Testverfahren, das zu dem sehr anfällig auf subjektive Einflüsse ist, ist z.B. für Massenuntersuchungen auf NPC, wie sie im südchinesischen Raum wünschenswert wären, ungeeignet. Erstrebenswert ist ein von der Zellkultur unabhängiges, einfaches Testsystem, das in weiten Bereichen automatisiert werden kann.

Untersuchung von Kreuzreaktionen:

Da in der Immunfluoreszenz, wie bereits oben erwähnt, keine Differenzierung zwischen einzelnen Antigenen möglich ist, wird die Erkennung von möglichen Kreuzreaktionen zwischen EBV und anderen Erregern sehr erschwert. Auch in der Immunpräzipitation ist ein solcher Nachweis nicht immer eindeutig zu führen, wie die Untersuchungen von EBV- und CMV-infizierten Seren gezeigt haben. So waren zwar EBV-positive/CMV-negative Seren vorhanden, jedoch keine EBV-negativen/CMV-positiven, die als Kontrolle unbedingt nötig sind. Die Schwierigkeit solche Seren zu erhalten, liegt darin, daß eine EBV-Infektion in den hochentwickelten Ländern meist, d.h. in über 95% der Fälle, bereits bis zum frühen Erwachsenenalter hin erfolgt ist. Bei einer CMV-Infektion liegt die Durchseuchung im Erwachsenenalter aber nur bei 10-50% (Krech, 1986). Das bedeutet, daß normalerweise erst eine EBV-Infektion durchlaufen wird, bevor eine Infektion mit CMV stattfindet.

Die Zuordnung dieser Seren in die Kategorie "frische" bzw. "abgelaufene" EBV-Infektion erfolgte auf Grund der EBNA-Daten. Seren von frisch EBV-Infizierten besitzen keine Antikörper gegen EBNA1, da diese erst 4-10

Wochen nach Erkrankung gebildet werden. Personen mit einer abgelaufenen EBV-Infektion sind dagegen anti-EBNA1 positiv. IgM-Antikörper sind in der Immunfluoreszenz nur bis zur ca. 12. Woche nach Erkrankung nachweisbar. Sie dienen daher ebenfalls als Marker für eine frische EBV-Infektion. Da es eine zeitliche Überschneidung zwischen dem Auftauchen der Antikörper gegen EBNA1 und dem Verlust der IgM-Antikörper gibt, sind anti-EBNA1 positive Seren mit IgM-Antikörpern gegen EA und VCA wie in Serum 5-10 durchaus möglich. Alle IgM-positiven Seren waren mit Protein A aus *Staph. aureus* absorbiert, so daß falsch positive Ergebnisse ausgeschlossen werden konnten. Diese in der Immunfluoreszenz (Tab. 1) untersuchten und als abgelaufene EBV deklarierten Seren besaßen auch in der Immunpräzipitation IgM-Antikörper gegen die EBV-Proteine p150 und p138. Auch hier sind falsch positive Ergebnisse auszuschließen, da vor dem Test die IgG-Antikörper über HPLC abgetrennt worden waren und die IgM-Fractionen als zweiten Selektionsschritt noch mit trägergebundenen anti- μ behandelt wurden. Die Seren wurden trotzdem einer "abgelaufenen EBV-Infektion" zugeordnet, da sie Antikörper gegen EBNA1 enthielten, und die klinischen Daten von T. Krech eine solche Zuordnung unterstützten. Ob diese IgM-Antikörper noch von einer kurz vor der CMV-Infektion abgelaufenen EBV-Erkrankung stammten oder ob diese IgM-Antikörper durch das aus einer früheren EBV-Erkrankung stammende, in den Zellen noch vorhandene Virus reaktiviert wurden oder ob es sich um eine Kreuzreaktion mit CMV handelte, konnte wegen der fehlenden EBV-Negativkontrolle nicht eindeutig geklärt werden. Zumindest in Serum 9 und 10 ist durch die Reaktion mit den IgM-Antikörpern gegen p138 eine Kreuzreaktion nicht auszuschließen, da diese Seren auf Grund der Immunfluoreszenzdaten von Patienten mit einer abgelaufenen EBV-Infektion in Verbindung mit einer frischen CMV-Infektion stammten. Bei Serum 5 und 6, die eine abgelaufene EBV-Infektion ohne CMV-Erkrankung zeigen, waren IgM-Antikörper gegen p138 nur sehr schwach vorhanden. IgM-Antikörper gegen p150 waren in allen Seren vorhanden, so daß keine Aussage über die Spezifität gemacht werden kann. Serum 2 wurde bereits einen Tag nach Erkrankung gewonnen, so daß noch sehr wenige Virusproteine vorhanden sind. Die Immunpräzipitation zeigte nur eine

110kD-Bande. Dieses Protein zählt zu den sehr frühen Proteinen, wie durch Versuche mit der Hemmung der Proteinbiosynthese ermittelt worden ist (Bayliss und Wolf, 1981). Die Seren von Patienten mit einer frischen EBV- und CMV-Erkrankung (Serum 2-4) besaßen in der Immunpräzipitation nur IgM-Antikörper und keine IgG-Antikörper. Serum 7-10 (abgelaufene EBV/frische CMV) reagierten dagegen im IgG mit den EBV-Proteinen p150, p143 und p110, wobei Serum 8 nur ein sehr schwaches Bandenmuster zeigte. Serum 9 und 10 zeigten zusätzlich noch eine Reaktion mit p138, p90 und p54. Diese Reaktionen mußten EBV-spezifisch sein.

Kriterien für die Auswahl relevanter Antigene

Mit Hilfe der Gentechnologie ist die Möglichkeit gegeben, bestimmte für die Diagnostik relevante Antigene oder Antigenteile, die möglichst keine kreureagierenden Eigenschaften besitzen sollten, in Prokaryonten wie auch in Eukaryonten als Vektoren zu klonieren und zu exprimieren. Die klonierten und exprimierten Antigene können sehr preiswert in großen Mengen produziert werden und sind nach einer Reinigung über ein bis zwei chromatographische Verfahren für einen ELISA einsetzbar. Die Auswahl der richtigen Antigene ist dabei von grundlegender Bedeutung für diese Arbeit. Durch die getroffene Auswahl von fünf definierten Antigenen wird zwar eine gewisse Einengung der Antigen-Antikörper-Reaktionen gegenüber der Immunfluoreszenz vorgenommen, diese Antigene stehen jedoch ohne eine aufwendige Zellkultur nach ihrer Reinigung in beliebig großer Menge für die Diagnostik zur Verfügung. Die Auswahl der Antigene bzw. der antigenen Determinanten sollte eine Differenzierung zwischen frischer, abgelaufener oder chronisch aktiver EBV-Infektion sowie die Erkennung von EBV-assoziierten NPCs ermöglichen. Da in der Immunfluoreszenz nur Antigenkomplexe erfaßt werden, für die Herstellung von rekombinanten Antigenen jedoch einzelne Antigene notwendig sind, wurden die für die verschiedenen Erkrankungen relevanten Antigene über Immunpräzipitationen und Western Blots aus den verschiedenen Antigen-Komplexen ausgewählt. Für die neuen diagnostischen Tests sollten auf alle Fälle wieder die Antigengruppen VCA, EA und EBNA, die auch in der Immunfluoreszenz vorhanden waren, benutzt werden. Zusätzliche

Informationen über chronische EBV-Erkrankungen wird über einen Test mit Membranantigen gp250/350 erwartet, der jedoch noch nicht etabliert ist. Die Membranantigene werden in der Routinediagnostik mit der Immunfluoreszenz nicht erfaßt. Bei einzelnen Seren konnte aber gezeigt werden, daß das gp250 von Seren von chronisch EBV-Erkrankten nicht erkannt wird (Jilg und Wolf, 1985). IgA-Antikörper gegen Membranantigene finden sich in 92% der chinesischen NPC-Seren. Diese Seren besitzen auch in den meisten Fällen IgA-Antikörper gegen VCA (95.2%) und EA (84.1%). Werden die Seren mit *Staph. aureus* vorabsorbiert, so steigt die Detektion auf 100% (Zhu et al., 1986; Pi et al., 1987). Die Überprüfung der Antikörper gegen Membranantigene wäre damit als Bestätigungstest bei Verdacht auf NPC oder chronische Infektion notwendig. Um die chronische EBV-Infektion besser einordnen zu können, wäre aber auch eine gesicherte klinische Diagnose notwendig. Diese ist jedoch durch das atypische Krankheitsbild (Beschwerden allgemeiner Art, wie z.B. Fieber und Lymphknotenschwellungen) äußerst schwierig zu stellen. Antikörper gegen EBNA1 finden sich bei abgelaufenen EBV-Infektionen. Bei einer frischen oder chronischen Infektion sind Antikörper gegen EBNA1 meist nicht nachweisbar. Somit dient der Nachweis von Antikörpern gegen EBNA1 in Kombination mit Antikörpern gegen VCA für die Unterscheidung zwischen frischer, abgelaufener und chronischer EBV-Infektion. IgG-Antikörper gegen das VCA p150 waren in der Immunpräzipitation außer bei sehr frühen EBV-Infektionen immer vorhanden. Dieses Antigen schien damit ein idealer Marker für eine EBV-Durchseuchung zu sein. Auch in der Immunfluoreszenz gelten IgG-Antikörper gegen VCA bei gleichzeitiger Anwesenheit von IgG-Antikörpern gegen EBNA als Zeichen einer abgelaufenen EBV-Infektion. Da in der Immunfluoreszenz bei frischen EBV-Infektionen und bei NPC-Patienten häufig IgG- bzw. IgG- und IgA-Antikörper gegen EA gefunden werden, wurde nach dazu korrelierenden Reaktionen in der Immunpräzipitation und im Western Blot gesucht. Dabei stellte sich heraus, daß für diesen Nachweis zwei Antigene besonders häufig erkannt wurden. Antikörper gegen p54EA schienen besonders für die Erkennung von frischen EBV-Infektionen geeignet zu sein, IgA-Antikörper gegen p138EA für den Nachweis von Nasopharynxkarzinomen. Antikörper

gegen p138 wurden in der Immunfluoreszenz nicht erfaßt, da in induzierten Raji-Zellen, die für den Nachweis von Antikörpern gegen EA benutzt werden, der für das p138 kodierende Teil der DNA deletiert ist.

Klonierung und Expression:

Nach der Auswahl der relevanten Antigene wurden die Proteinsequenzen über Computerprogramme auf ihre antigenen Determinanten hin untersucht. In den ersten Klonierungsversuchen wurde die Übereinstimmung der vorhergesagten antigenen Strukturen mit der Antigenität der klonierten Produkte im Western Blot überprüft. Um möglichst stabile Produkte zu erhalten und um damit einen Abbau der Antigenität durch Degradation der rekombinanten Antigene zu vermeiden, wurden die Klone als β -gal-Fusionsproteine konstruiert. Die Reinigung der β -gal-Fusionsproteine ist durch das hohe Molekulargewicht der β -Galactosidase (116kD) leichter durchzuführen und zu überprüfen als bei Nicht-Fusionsproteinen, da in einem Molekulargewichtsbereich über 120kD fast keine E.coli Proteine mehr exprimiert werden (Abb. 11). Ein möglicher Nachteil dieser heterologen Fusionsproteine ist, daß der große β -Galaktosidase-Teil die Tertiärstruktur des EBV-Anteils so verändert, daß die antigenen EBV-Determinanten verdeckt oder zerstört werden. Durch den Kontakt mit E.coli finden sich außerdem sehr häufig anti- β -Galaktosidase-Antikörper beim Menschen. Das bedeutet, daß EBV-unspezifische Reaktionen nur schwer zu vermeiden sind. Anti- β -Galaktosidase-Antikörper können aber durch Zugabe von β -Galaktosidase abgefangen werden. Dabei kann es jedoch ebenfalls zu Konformationsänderungen des Antigen-Antikörper-Komplexes kommen, so daß wiederum die Antigenität gestört ist. Die Konzentration der β -Galactosidase sollte idealerweise im Gleichgewicht mit den anti- β -Gal-Antikörpern stehen oder im leichten Überschuß vorhanden sein. Ein Unterschuß an β -Galaktosidase muß vermieden werden, da sonst noch freie anti- β -Galaktosidase-Antikörper mit dem rekombinanten Antigen reagieren können. Die Absättigung der Seren mit β -Galaktosidase führte in den Versuchen mit dem β -gal-VCA-Fusionsprotein (Abb. 14) dann auch zu einer schlechten Reaktion gegen den p150-Teil.

Der Zusatz von anti- β -Galaktosidase-Antikörpern aus dem Schaf zu dem an die ELISA-Platten gebundenen Antigen ist leichter durchführbar. Die anti- β -Galaktosidase-Antikörper lassen sich dem Gelatinepuffer, der zur Blockierung der freien Bindungsstellen auf der Platte dient, zufügen. Es kann mit einem großen Antikörperüberschuß gearbeitet werden, da die Konformation des Antigens durch die Bindung an die Platte nicht mehr verändert werden kann. Die ursprüngliche Veränderung der Tertiärstruktur des Antigens durch den β -Galaktosidase-Teil bei der Klonierung ist aber auch hier gegeben. Die Testergebnisse waren bei dieser Methode jedoch deutlich besser als bei der Absättigung der Seren mit β -Galaktosidase. Allerdings sind anti- β -Galaktosidase-Antikörper z.Zt. käuflich nur sehr schwer zu erwerben. Es wäre hier nötig, die Antikörper im Schaf oder in der Ziege selbst herzustellen und zu reinigen, wenn der Test routinemäßig benutzt werden soll. Dies bedeutet jedoch einen zusätzlichen zeitlichen Aufwand. Auch müssen die Antikörper genau charakterisiert und standardisiert werden, um zu reproduzierbaren Ergebnissen zu gelangen. Zusammenfassend ist zu sagen, daß der Vorteil der β -Galaktosidase, die Fremdproteine vor Proteolyse zu schützen, und die leichtere Reinigung des β -gal-Fusionsproteins, nicht die Nachteile einer schlechten Antigenität oder unspezifischen Reaktion aufwiegt, so daß β -gal-Fusionsproteine nicht für eine Routinediagnostik geeignet sind.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden daher Nicht-Fusionsproteine (z.B. pINDUAH375) konstruiert. Diese Proteine besaßen nur eine antigene Determinante des jeweiligen EBV-Proteins, so daß die Antigenpräsentation mit Sicherheit gegenüber dem gesamten EBV-Antigen verändert war. Einer guten Expression des EBV-Teils, wie sie im Falle des pINDUAH375 oder des pUC19LP1.9 in der Coomassie-blue Färbung zu sehen ist, stand oft eine schwache Reaktion im Western Blot mit Seren von NPC-Patienten entgegen (Abb. 16 und 51). Außerdem war zu erwarten, daß verschiedene EBV-positive Seren unterschiedliche Determinanten eines Antigens erkennen. Konstrukte mit einer einzelnen antigenen Stelle erfüllen damit nicht die Forderung, universell erkannte Epitope für Antikörper gegen EBV zu besitzen. Zusätzlich waren diese Konstrukte (z.B. pUC19LP1.9) oft äußerst

instabil, so daß reproduzierbare Ergebnisse in der Diagnostik nicht zu erzielen wären.

Im Konstrukt pUC9MBcE3.2, das auch einem Nicht-Fusionsprotein entspricht, ist als Einziges von allen von uns verwendeten rekombinanten Antigenen der gesamte Leserahmen des entsprechenden Gens vorhanden. Es kodiert für das frühe Antigen p54, das in seiner nichtphosphorylierten Form ein Molekulargewicht von 47kD hat. Die Expression dieses rekombinanten Antigens war relativ gering, die Antigenität jedoch sehr stark und das Produkt war stabil.

Auf Grund der Ergebnisse mit den heterologen Fusionsproteinen und den Nicht-Fusionsproteinen -mit Ausnahme des pUC9MBcE3.2- wurde die Klonierung von autologen Fusionsproteinen in Betracht gezogen. Durch eine geeignete Kombination von verschiedenen Fragmenten eines Antigens sollten stabile Konstrukte mit mehreren antigenen Stellen geschaffen werden. Diese Strategie wurde bei der Klonierung des p150- und des p138-Konstrukts erfolgreich eingesetzt. Die Klone enthielten die in Vorversuchen ermittelten besten antigenen Stellen und wurden stabil exprimiert. Die Notwendigkeit, mehrere antigene Determinanten zu präsentieren, wurde bei pUCARG1140, das zwei Teile des p138 enthält, ersichtlich. Untersuchungen, die von M. Motz (Motz et al., 1986) durchgeführt wurden, mit NPC-Seren zeigten, daß verschiedene Seren nur eine der beiden Determinanten "600bp" bzw. "540bp" erkennen. Ein Fehlen von weiteren möglicherweise wichtigen antigenen Determinanten kann auch bei autologen Fusionsproteinen nicht ausgeschlossen werden. Nur die Klonierung des gesamten Leserahmens eines Gens, wie es bei pUC9MBcE3.2 geschehen ist, schließt fehlende Determinanten aus. Mögliche sterische Hinderungen oder Veränderungen der Determinanten durch die durch die Klonierung bedingte neue Tertiärstruktur sind jedoch jederzeit möglich.

Reinigung und Identifizierung der EBV-Anteile

Eine exakte Trennung der E.coli-Proteine von den EBV-Anteilen ist für den Erfolg der Reinigung unbedingt erforderlich, da beim Menschen häufig Antikörper gegen E.coli-Proteine vorhanden sind. Da für die erste Überprüfung der Reinigung häufig ein Western Blot benutzt wird und

Unterschiede im Molekulargewicht zwischen spezifischer EBV-Bande und unspezifischen E.coli-Banden sehr gering sein können bzw. nicht vorhanden sind, verhindern schon geringste Verschiebungen der Banden bei der Elektrophorese von zwei Gelen bzw. Blots eine eindeutige Zuordnung. Der Nachweis mit einem EBV-negativen Kaninchenserum und mit einem EBV-spezifischen Kaninchenserum im zweifarbigen Western Blot erlaubt über zwei verschiedene spezifische Detektionssignale diese eindeutige Zuordnung. Die Reinigung der rekombinanten Antigene erfolgte in den meisten Fällen über Ionenaustausch-Chromatographie. Für die Trennung über Anionenaustauscher wurde meist bei einem pH-Wert von 8.0 und ohne SDS gearbeitet, da SDS durch seine negative Ladung die Bindungsstellen des Anionenaustauschers blockiert. Der Zusatz von 8M Harnstoff, um das Protein in Lösung zu bringen, führt zu einer besseren Präsentation der Konstrukte unter gleichzeitiger Zerstörung der Wasserstoffbrücken-Bindungen. Auf die Gesamtladung des Proteins nimmt Harnstoff keinen Einfluß. Die Bindung an den Anionenaustauscher wird durch die Dissoziation noch verstärkt, da nur geladene Proteine mit Ionenaustauscher in Wechselwirkung treten können.

Für die Konstrukte des p138, die an ihrem 5'-Ende fünf Argininreste besaßen, welche den Proteinen eine positive Nettoladung geben sollten, war eine Kationenaustausch-Chromatographie vorgesehen. Bei dieser Chromatographie binden die positiven Ladungen der Probe an die negativ geladenen funktionellen Gruppen (Carboxymethyl (CM) oder Sulphopropyl (SP)) des Ionenaustauschers. Bei pUCARG680 zeigte sich der Einfluß des isoelektrischen Punkts des Konstrukts auf die Trennung mit Ionenaustauscher am deutlichsten. Das Konstrukt besitzt im Western Blot stets zwei antigene Banden, die in unterschiedlichem Maß vorhanden und reaktiv sind. pUCARG680 ist ein verkürztes Konstrukt aus pUCARG1140 und besitzt sowohl einen Teil des 540bp-Stücks als auch des 600bp-Stücks. Durch das Anfügen des 540bp-Teils wurde die positive Nettoladung, die durch die fünf Arginine bei pUCARG601, das den 540bp-Teil nicht besitzt, vorhanden ist, offensichtlich kompensiert. Die Überprüfung der Sequenzen in diesen Bereichen und die Berechnung der Ladungen der einzelnen Aminosäuren zeigte, daß sowohl der 540bp-Teil als auch der 600bp-Teil

eine negative Nettoladung (-3) besitzen. Die Arginine konnten diese negative Ladung zwar bei einem Teil aufheben, nicht jedoch, wenn beide negativ geladenen p138-Fragmente vorhanden waren.

In der zweidimensionalen Elektrophorese wurden die isoelektrischen Punkte der beiden spezifischen Banden von pUCARG680 mit pH7.0-6.2 (je nach Modifikation) und mit pH8.0 bestimmt. Die Trennung über Anionenaustauscher könnte damit für die Bande mit dem isoelektrischen Punkt von 8.0 nur bei einem pH-Wert über 9.0 erfolgen, da die Trennbedingungen immer eine pH-Stufe über dem isoelektrischen Punkt (Anionenaustauscher) bzw. unter dem isoelektrischen Punkt (Kationenaustauscher) liegen sollten. Bei einem pH-Wert von 9.0 oder darüber ist jedoch der Anionenaustauscher mit der Diethylaminoethyl-Gruppe im ungeladenen Zustand und somit wirkungslos. Für eine Trennung am Kationenaustauscher wäre ein theoretischer pH-Wert von 5.2-5.7 als geeignet anzusehen. Dieser pH führte für die Bande mit dem isoelektrischen Punkt von 8.0 jedoch zu erheblichen sterischen und ionischen Veränderungen, so daß eine Bindung nicht mehr möglich war. Die Bande mit dem isoelektrischen Punkt von 7.0 lag dagegen im idealen Trennbereich und das Protein wurde an die Säule gebunden. Für die Modifikation des Proteins (ebenfalls untere Bande), die einen isoelektrischen Punkt von 6.2 hat, war die Dissoziation noch zu gering. Das Protein lag überwiegend im ungeladenen Zustand vor und konnte nicht binden. Damit wurde eine Reinigung des Produkts über nur einen Trennschritt unmöglich. pUCARG680 mußte über mindestens zwei Ionenaustauscher-Säulen bei verschiedenen pH-Werten getrennt werden, was jedoch eine Minderung der Antigenität bedeuten würde.

pUCARG1140 besitzt zwei vollständige antigene Determinanten des p138. Es ist damit am besten von allen p138-Konstrukten für die Diagnostik geeignet. Durch die Fusion der beiden EA-Teile ist die Stabilität des Produkts gegenüber den anderen p138-Konstrukten erhöht, wenn auch ein gewisser Verlust des Inserts bei längeren Passagierungen zu sehen war. Das virale Protein schien toxisch für die Bakterien zu sein, so daß ein Verlust des Inserts und die Rekombination der Plasmide einen Selektionsvorteil für die Bakterien bedeutete. Das Fusionsprotein zeigte wie schon pUCARG680

keine positive Nettoladung mehr, so daß kein Vorteil für die Trennung über Kationenaustauscher gegeben war.

Die Bindung der monoklonalen Antikörper gegen pUCARG1140 als Liganden an CNBr-aktivierte Sepharose für die Affinitätsreinigung sollte ein sehr sauberes und damit hoch spezifisches Antigen liefern. Die Bindung zwischen monoklonalem Antikörper und Antigen war jedoch so stabil, daß selbst stärkste Elutionsbedingungen den Antigen/Antikörper-Komplex nicht mehr trennen konnten. Da die Mäuse mit einem gereinigten Produkt des pUCARG1140 immunisiert worden waren, bildeten sie Antikörper, die exakt zu dem p138-Konstrukt paßten. Damit fand möglicherweise eine Potenzierung der Bindungskräfte statt, so daß die Affinitätskonstante $K=[AK \cdot AG]/[AK][AG]$ stark anstieg, und das Antigen unter biologischen Elutionsbedingungen, die für den Erhalt der Antigenität erforderlich sind, irreversibel an den monoklonalen Antikörper gebunden wurde.

Nach der Reinigung des p54-Konstrukts über Anionenaustauscher war eine Reinheit des rekombinanten Antigens von knapp 80% erreicht worden. Vermutlich lag die Reinheit des Produkts jedoch über den errechneten 80%, da bei der Remissionsmessung im Densitometer auch Unebenheiten des Papiers in die Berechnung miteingehen, so daß immer mit einem Rauschen von ca. 10% zu rechnen ist. Mit bloßem Auge waren außer der spezifischen Bande keine weiteren Banden sichtbar.

Die Membranproteine gp250/350 sind stark glykosyliert (Abb. 49). Die glykolysierten Stellen sind besonders hydrophil, so daß andere nicht glykosylierte, hydrophile Bereiche kaum vorhanden sind. Mit 1.9kb ist das Insert des Konstrukts pUC19LP1.9 fast so groß wie das Plasmid. Dabei steigt die Gefahr einer nicht vollständigen Translation des Konstrukts bzw. Rekombination der Plasmide. Tatsächlich wurde das Produkt entweder unvollständig translatiert oder bei der Reinigung über Mono Q degradiert. Bei der Reinigung wurde pUC19LP1.9 bei pH7.5 nicht an die Säule gebunden, d.h. das Konstrukt lag im ungeladenen oder im positiv geladenen Zustand vor. Da unter diesen Bedingungen jedoch die E.coli-Proteine gebunden wurden, konnte trotzdem eine Abtrennung des gp250/350-Konstrukts erreicht werden.

ELISA und seine Bewertung

Für den Aufbau eines ELISAs ist die Präsentation der antigenen Strukturen im nativen Zustand notwendig. Die Antigene, die teilweise in denaturierenden Puffersystemen gereinigt worden waren, mußten daher über Dialyse renaturiert werden. Diese Rückfaltung der Proteine gelingt möglicherweise nicht immer vollständig, so daß mit einem Aktivitätsverlust gerechnet werden muß.

Im ELISA ist im Gegensatz zum Western Blot keine Unterscheidung von unspezifisch positiver Reaktion und spezifisch positiver Reaktion möglich. Daher sind Kontrollen, die unspezifische Reaktionen z.B. zwischen Antigen und zweitem Antikörper oder zwischen Antigen und Puffer bzw. Farbstoff aufzeigen, essentiell. Da außerdem jede Plattencharge andere Bindungskapazitäten aufweist und eine gewisse Ungenauigkeit beim Pipettieren berücksichtigt werden muß, müssen bei jedem Versuch Standardseren in verschiedenen Verdünnungsstufen mitgeführt werden. Für eine quantitative Aussage muß die Farbreaktion des ELISAs im linearen Meßbereich liegen, d.h. bei einer OD_{486} von 0.2-1.5. Bei höheren Werten geht die Linearität verloren, die Gerade geht in eine flach auslaufende Kurve über. Der Anteil der einzelnen Antikörperklassen im Serum ist sehr unterschiedlich: 70-75% IgG-Antikörper, ca. 10% IgM-Antikörper und 15-20% IgA-Antikörper. Durch den großen Überschuß an IgG-Antikörpern kann es zu Schwierigkeiten bei der Detektion der IgA-Antikörper und im verstärkten Maße der IgM-Antikörper kommen. Außerdem können Rheumafaktoren eine unspezifische IgM-Reaktion auslösen, da sie IgM-Antikörper gegen IgG besitzen. Es reagieren dann nicht mehr nur die spezifischen IgM-Antikörper, sondern auch unspezifische IgM-Antikörper. Unspezifische IgM-Antikörper in Seren, die spezifische IgG-Antikörper enthalten und damit mit dem EBV-Antigen komplexieren, reagieren über diese spezifischen IgG-Antikörper unspezifisch im ELISA. Um diese falsch positiven Ergebnisse zu verhindern, wurden die IgG-Antikörper durch Bindung an Protein A aus *Staph. aureus* aus dem Serum entfernt. Eine andere Alternative ist der Aufbau eines anti- μ -capture-Tests, bei dem anti- μ -Antikörper an die ELISA-Platten gebunden werden, die IgM-Antikörper im Serum daran binden und dann eine spezifische Reaktion mit EBV-

Antigen durchgeführt wird. Für den Nachweis der IgA-Antikörper kann ebenfalls eine Entfernung der IgG-Antikörper die Spezifität des Tests erhöhen, wie verschiedene Gruppen bei chinesischen NPC-Patienten gezeigt haben (Zhu et al., 1986; Pi et al., 1987).

Für die Zusammenfassung der ELISA-Ergebnisse wurden Balkendiagramme angefertigt, die die Mittelwerte (m) der Seren als Säule zeigten. Um die Streuung der Einzelwerte zu berücksichtigen, wurde die Standardabweichung (s) berechnet. Nach der GAUSSschen Kurve liegen 2/3 der Proben innerhalb der einfachen Standardabweichung und 95% innerhalb der doppelten. Die Signifikanz des ELISAs kann damit auf verschiedene Weise definiert werden:

1. Signifikant sind alle Werte, die doppelt so hoch sind wie die Werte der Negativkontrolle ($m_p \geq 2m_n$)
2. Signifikant sind alle Werte, die über dem Mittelwert der negativen Seren plus einer Standardabweichung liegen ($m_p - s_p \geq m_n + s_n$)
3. Signifikant sind alle Werte, die über dem Mittelwert der negativen Seren plus doppelter Standardabweichung liegen ($m_p - 2s_p \geq m_n + 2s_n$)

Tabelle 5: Signifikanz der ELISA-Tests für die einzelnen EBV-Infektionen

Ak- Klasse	Antigen	$m_p \geq 2m_n$	$m_p - s_p \geq m_n + s_n$	$m_p - 2s_p \geq m_n + 2s_n$
IgM	p150	frisch; abgel.	frisch; abgel.	--
	p138	frisch	frisch	--
	p54	frisch	frisch	--
	gp250/350	n.t.	n.t.	n.t.
IgG	p150	frisch; abgel.; NPC	frisch; abgel.; NPC	frisch
	p138	frisch; NPC	frisch; NPC	NPC
	p54	frisch; NPC	frisch; NPC	NPC
	gp250/350	NPC	NPC	--
IgA	p150	frisch; abgel.; NPC	frisch; abgel.; NPC	(NPC)
	p138	NPC; NPC-China	NPC; NPC-China	(NPC-China)
	p54	frisch; NPC	(frisch); NPC	NPC
	gp250/350	NPC	NPC	--

Tab. 5: Abk.: m_p = Mittelwert der positiven Seren
 m_n = Mittelwert der negativen Seren
 s_p = Standardabweichung der positiven Seren
 s_n = Standardabweichung der negativen Seren
n.t. = nicht getestet

Es sind jeweils die Serengruppen angegeben, deren Werte signifikant waren. Nicht angegebene Gruppen lagen unter den geforderten Mindestwert.

Die Auswertung der Balkendiagramme nach den oben genannten Gesichtspunkten in Tabelle 5 zeigt, daß das strengste Auswahlkriterium die doppelte Standardabweichung ist, und meist nur die Seren der NPC-Patienten diese Forderung einer Signifikanz erfüllen. So traten z.B. Antikörper gegen p138 bei der Auswahl der diagnostisch relevanten Antigene in der Immunpräzipitation und im Western Blot besonders häufig

bei NPC-Patienten auf. Der ELISA bestätigte diese Ergebnisse. Patienten mit einer frischen oder abgelaufenen EBV-Erkrankung erreichten im Mittel nicht den für die Aussage "positiv" geforderten Faktor $F \geq 2$ bei den Antikörpern gegen p138. Extrem hohe Werte bei den IgA-Antikörpern erzielten die Seren von chinesischen NPC-Patienten. Sie lagen ungefähr 3mal höher als die Werte der deutschen NPC-Patienten. Im chinesischen Raum sind im Gegensatz zu Europa (Krüger et al., 1981) alle Nasopharynxkarzinome EBV-positiv. Es gibt jedoch beim NPC keinen Hinweis auf chromosomale Rearrangements, wie sie beim Burkitt's Lymphom bekannt sind. Die Erkrankung scheint eine genetische Prädisposition für bestimmte HLA-Typen zu besitzen. NPC-Patienten haben eine verminderte EBV-spezifische, T-Zell-vermittelte Immunität. Kommen noch umweltbedingte Einflüsse, wie z.B. Ernährung mit stark gesalzenem Fisch oder bestimmten Kräutern, so steigt das Erkrankungsrisiko stark an (Simons, 1985).

Doppelblindstudie

Die Doppelblindstudie, die in Zusammenarbeit mit Prof. Morgenstern und Dr. Koldovsky, HNO-Klinik Düsseldorf, durchgeführt worden war, sollte zeigen, ob die EBV-Diagnostik spezifisch EBV-korrelierte Karzinome erkennt oder ob auch andere nicht durch EBV bedingte Tumorarten erfaßt werden. Im Gegensatz zur Phase des ELISA-Aufbaus, in welcher in der Immunfluoreszenz positive Seren mit dem klinischen Befund "Infektiöse Mononukleose" oder "NPC" ausgewählt worden waren, wurden jetzt Seren getestet und beurteilt, von denen keinerlei Parameter bekannt waren. Durch die fehlenden klinischen Angaben war eine Beurteilung von falsch-positiven Werten auf Grund von Immunkomplexen (z.B. bei Autoimmunkrankheiten) wie auch von falsch-negativen Ergebnissen (z.B. bei Immunsuppression) nur schwer möglich. Trotzdem konnten sowohl im ELISA als auch in den Immunfluoreszenztesten beispielweise eindeutige Unterschiede bei den lymphoepitheloiden NPCs und den Plattenepithel-NPCs gezeigt werden. Wie schon Krüger et al. (1981) beschrieben haben, sind Plattenepithel-NPCs nur sehr selten mit EBV assoziiert. Es fanden sich in seinen Studien keine signifikanten IgA-Titer gegen VCA. Auch waren die Titer gegen EBNA und

EA extrem niedrig. Bei der Doppelblindstudie zeigten sich im ELISA und im Immunfluoreszenztest (bis auf einen Fall) ebenfalls bei den Plattenepithel-NPCs keine IgA-Antikörper, ebenso konnten IgG-Antikörper gegen p54 und p138 im ELISA nicht nachgewiesen werden. Die IgG-Antikörper gegen p150 lagen, wie auch bei Krüger beschrieben, in einem Bereich, der den Antikörpertitern von Seren einer abgelaufenen EBV-Infektion entsprach. Im Gegensatz zu den Plattenepithel-NPCs waren IgG-Antikörpertiter gegen VCA bei Seren von Patienten mit einem lymphoepitheloiden NPC im ELISA wie in der Immunfluoreszenz erhöht. In neun verschiedenen Seren bzw. Serengruppen von Patienten mit einem lymphoepitheloiden NPC waren bei 67% der Seren im ELISA und bei 56% der Seren im Immunfluoreszenztest IgA-Antikörper gegen p150 vorhanden. Die Entdeckungsrate lag damit unter der in der Literatur (Zhu et al., 1986; Pi et al., 1987) beschriebenen Rate. Dies kann mehrere mögliche Gründe haben. Zum einen wurden diese zitierten Studien mit Seren von Patienten aus dem chinesischen Raum durchgeführt. Die Titer dieser Seren liegen, wie auch in dieser Arbeit gezeigt wurde, jedoch wesentlich über den Titern der Seren von Patienten aus Europa, so daß eine höhere Entdeckungsrate bei gleicher Testführung möglich ist. Ob sich die Empfindlichkeit des Tests durch Präadsorption der Seren mit Protein A aus *Staph. aureus* steigern läßt, wie das von Pi et al. (1987) an chinesischen Seren gezeigt wurde, wurde nicht überprüft. Andererseits zeigten sämtliche Seren von Patienten mit lymphoepitheloiden NPCs der Doppelblindstudie sowohl in der Immunfluoreszenz als auch im ELISA außergewöhnlich niedere Titer gegen VCA. Da durch die Histologie und die Antikörpertiter gegen EA eine Korrelation zwischen EBV und NPC gesichert war, lag der Verdacht auf eine Degradation durch Fehler bei Serumgewinnung, Transport oder Lagerung nahe. Die Überprüfung des allgemeinen Immunglobulingehalts bei einem Teil der Seren bestätigte den Verdacht jedoch nicht. Der Gesamt-IgG-Gehalt lag bei allen überprüften Seren (außer Serum E) an der oberen Grenze des Normbereichs. Bei Serum E wurde nur knapp die untere Grenze des Referenzbereiches erreicht. Möglicherweise wäre hier ein Ansatzpunkt für die fehlende Reaktion des Serums im IgG-ELISA gegen p150. Eine Minderung der Titerhöhe könnte in der Immunfluoreszenz auch durch die

Zellkultur bedingt sein, da durch häufiges Passagieren der Zelllinien eine Veränderung bei der Produktion von VCA möglich ist. Da im ELISA nicht das gesamte p150-Protein kloniert wurde, könnten eventuell wichtige antigene Determinanten fehlen. Möglicherweise ist auch ein weiteres Antigen aus dem VCA-Komplex nötig, um alle Patienten mit Antikörper gegen VCA zu erfassen.

Die histologische Differenzierung der verschiedenen Nasopharynxkarzinome und ihre Korrelation zu EBV ist äußerst schwierig. Eine Klassifizierung wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen vorgenommen (Micheau et al., 1978; Shanmugaratnam et al., 1979; Krüger et al., 1981). Um die Histologie abzusichern, müßte mit dem jeweiligen Gewebe eine in situ Hybridisierung durchgeführt werden, um die eventuell vorhandene EBV-DNA nachzuweisen. Die Serologie ist in den Fällen, in denen IgA-Antikörper gegen p138 zusammen mit IgG-Antikörper gegen p150 und EBNA1 nachgewiesen werden, eindeutig, d.h. es handelt sich hier immer um EBV-korrelierte Nasopharynxkarzinome. Der Nachweis bei NPC-Patienten von IgG- und IgA-Antikörper gegen p138, die in der Immunpräzipitation und im Western Blot stets gefunden worden waren, war im ELISA nicht immer möglich. Diese Diskrepanz weist ebenfalls auf das Problem der Präsentation von einzelnen antigenen Determinanten anstatt des gesamten Antigens hin. Möglicherweise müssen noch zusätzliche antigene Stellen in Plasmide kloniert werden, um einen größeren Bereich an Patienten abzudecken. In den Fällen, in denen keine IgA-Antikörper gegen p138, sondern nur IgG- und IgA-Antikörper gegen p150 und/oder p54 vorhanden sind, kann nur ein Verdacht auf ein EBV-assoziiertes NPC ausgesprochen werden. Hier muß die Histologie die Bestätigung dazu geben bzw. im umgekehrten Fall muß die Histologie durch die Serologie abgesichert werden.

Der Nachweis von Antikörpern gegen EBNA1 im ELISA spiegelt möglicherweise auch nicht das Ergebnis der Immunfluoreszenz wieder. Aus Studien von W. Jilg (pers. Mitteilung) ist bekannt, daß Antikörper gegen EBNA1 im ELISA seltener zu finden sind als Antikörper gegen EBNA in der Immunfluoreszenz. Da es sich bei den nukleären Antigenen auch um einen Komplex aus mehreren Proteinen handelt und zu dem nicht das ganze Gen von EBNA1 in das Plasmid kloniert wurde, lassen sich negative

Ergebnisse im ELISA erklären. Vielleicht liegen jedoch hier auch Chancen für eine Feindifferenzierung. So weiß man, daß zuerst Antikörper gegen EBNA2 vor allen anderen Antikörpern gegen EBNA erscheinen (Henle et al., 1987). Möglicherweise könnten diese Antikörper einen Übergang von einer frischen zu einer abgelaufenen EBV-Infektion kennzeichnen.

Zusammenfassung der serologischen Nachweise für EBV-Erkrankungen

Als diagnostisch wichtige Parameter für eine frische EBV-Infektion dienen der Nachweis der IgM-Antikörper gegen das Viruskapsidantigen p150 und das frühe Antigen p54. Bei einer abgelaufenen EBV-Infektion sind stets Antikörper der IgG-Klasse gegen p150 vorhanden, sowie eine Reaktion gegen EBNA1. NPC-Patienten zeigen hohe IgA-Titer gegen p138. Soweit bis heute bekannt ist, besitzen Patienten mit einer chronisch aktiven EBV-Erkrankung keine Antikörper gegen EBNA und gegen die Membranproteine gp250/350. IgG-Antikörper gegen VCA sind jedoch wie bei einer abgelaufenen EBV-Infektion vorhanden. Sollten diese serologischen Marker nicht ausreichen, so können noch zusätzliche Tests zu diesen oben genannten durchgeführt werden. Antikörper gegen diese zusätzlichen Marker müssen nicht bei jedem Patienten vorhanden sein, so daß nur die Reaktion mit den jeweiligen Antigenen eine diagnostische Aussage zuläßt, nicht jedoch das Fehlen dieser Antikörper einen Rückschluß auf die Erkrankung gibt.

Klinische Diagnose	Serologische Bestätigung im ELISA		Ergänzende Tests im ELISA	
	AK	rekomb. AG	AK	rekomb. AG
Frische Infektion	pos. IgM	p54EA	pos. IgG	p54EA
	pos. IgM	p150VCA		
	pos. IgG	p150VCA		
Abgelaufene Infektion	pos. IgG	p150VCA	pos. IgG	gp250/350MA
	pos. IgG	EBNA1		
"Chronische" Infektion	pos. IgG	p150VCA	pos. IgM	p54EA
	neg. IgG	EBNA(?)	neg. IgG	gp250/350MA(?)
Nasopharynxkarzinom	pos. IgA	p138EA	pos. IgG	gp250/350MA
	pos. IgG	p150VCA	pos. IgA	gp250/350MA
	pos. IgG	EBNA1	pos. IgG	p54EA
			pos. IgA	p54EA
			pos. IgA	p150VCA

Tab. 6 Serologische Parameter für EBV-korrelierte Erkrankungen bei Durchführung von ELISAs mit gentechnologisch hergestellten Antigenen

In der Immunfluoreszenz besteht keine Möglichkeit zu unterscheiden, wie die einzelnen Seren auf die verschiedenen Antigene einer Antigengruppe reagieren. Anders ist dies in einem ELISA, der mit einzelnen Proteinen als Antigene durchgeführt wird. So zeigte der ELISA gegen p54 und p138, die beide zu den frühen Antigenen zählen, daß die verschiedenen menschlichen Seren äußerst unterschiedlich reagieren. Die in der Doppelblindstudie zwischen Immunfluoreszenz und ELISA differierenden Ergebnisse (Tab. 3) müssen daher genauer analysiert werden. Eine positive Immunfluoreszenz und ein negativer ELISA kann ein Hinweis auf bestehende Kreuzreaktionen,

die nur in der Immunfluoreszenz sichtbar werden, sein. Ebenso kann der ELISA durch seine bestimmten antigenen Determinanten auch zu spezifisch sein, so daß manche Seren diese Antigene nicht erkennen können, und der ELISA negativ ist.

Den rekombinanten Antigenen fehlen mit Ausnahme des p54-Proteins antigene Epitope. Diese fehlenden Epitope sind im Western Blot zwar nicht oder nur sehr schwach immunogen, sie könnten aber für die Tertiärstruktur des gesamten Antigens von Bedeutung sein. Die Faltung des gentechnologisch hergestellten Antigens wird sicherlich in manchen Fällen von der Struktur des natürlichen Antigens abweichen. Auch können die verschiedenen Reinigungsverfahren Einfluß auf die Faltung des Proteins und seiner Immunogenität haben. Seren können unterschiedliche Epitope eines Proteins erkennen, wie am Beispiel von pUCARG1140 mit dem 540bp- und dem 600bp-Epitop gezeigt wurde (Abb. 33). Die Wahrscheinlichkeit, daß manche Seren die klonierten Epitope gar nicht oder nur schwach erkennen, ist zwar gering, da es sich um die am meisten immunogenen Stellen handelt, aber es wäre zumindest denkbar, daß in solchen Fällen dann die Reaktion unter dem gewählten cut off liegt. Breit angelegte Studien von parallelen Untersuchungen der Seren mit Hilfe der Immunfluoreszenz und des ELISAs müssen in der Zukunft zeigen, ob die rekombinanten Antigene alle EBV-positiven Seren erfassen bzw. ob alle in der Immunfluoreszenz positiven Seren wirklich EBV-spezifisch positiv sind. Um einen schnellen und in jedem Labor durchführbaren Test zu bekommen, wäre außer einem ELISA auch ein Spot-Test denkbar. Er würde vom Aufbau her einem Immunoblot entsprechen, nur daß als an die Nitrocellulose gebundene Proteine die einzelnen gereinigten Antigene benutzt werden, die dann nicht mehr über eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und einem anschließenden Elektrottransfer auf Nitrocellulose gebracht werden, sondern direkt auf die Nitrocellulose aufgetropft werden. Diese Teststreifen könnten nach Absättigung der nicht besetzten Bindungsstellen, luftdicht verpackt, aufbewahrt werden und bräuchten bei Bedarf nur mehr mit den Seren und anschließend mit dem 2. Antikörper inkubiert und gefärbt werden.

Die Alternative, statt rekombinanter Antigene synthetische Peptide als Antigene einzusetzen, stößt prinzipiell auf dieselben Probleme. Die Peptidsynthese kann jedoch im Ausnahmefall, z.B. um gentechnologisch instabile oder schwer exprimierbare Antigenepitope herzustellen, als Ergänzung zu den rekombinanten Antigenen dienen. So wurden synthetische Peptide bereits beim Nachweis von HIV-Infektionen (HIV-1 und HIV-2) als Antigene im ELISA eingesetzt (Modrow et al., 1987).

Die EBV-Serologie ist durch die Entwicklung eines ELISAs mit Hilfe von rekombinanten Antigenen wesentlich einfacher und billiger geworden. Der Test läßt sich leichter in allen Labors anwenden, da er objektivierbar und automatisch ablesbar ist. Eine Weiterentwicklung hin zu einem Spot-Test auf Nitrocellulosestreifen würde die EBV-Serologie jeder Arztpraxis zugänglich machen. Durch eine verbesserte Frühdiagnose EBV-korrelierter Karzinome sind die Chancen eines Therapieerfolges für den Patienten deutlich erhöht. Schon allein deshalb ist es wichtig, daß die EBV-Serologie heute mit Hilfe des ELISAs als Nachweismethode für Massenuntersuchungen zur Verfügung steht. Auch der chronischen EBV-Infektion wird in zunehmendem Maß Beachtung geschenkt. Hier ist es besonders wichtig, daß der klinische Befund und die Laborwerte gemeinsam gesehen werden. Erste Therapieversuche wurden bereits mit Acyclovir und Interleukin-2 durchgeführt (Henle et al., 1987).

G. Literatur

Andersson-Anvert, A., Forsby, N., Klein, G. and Henle, W.: Relationship between the Epstein-Barr virus and undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: correlated nucleic acid hybridisation and histopathological examination. *Int. J. Cancer*, 20 (1977) 486-491

Argos, P., Hanei, M. and Garavito, M.: The Chou-Fasman secondary structure prediction method with an extended data base. *FEBS Letters*, 93 (1978) 19-24

Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., Seguin, C., Tuffnell, P.S. and Barrell, B.G.: DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 310 (1984) 207-211

Bayliss, G.J. and Nonoyama, M.: Mechanisms of infection with Epstein-Barr virus III. The synthesis of proteins in superinfected Raji cells. *Virology*, 87 (1978) 204-207

Bayliss, G.J. and Wolf, H.: Effect of the arginine analog canavanine on the synthesis of Epstein-Barr virus induced proteins in superinfected Raji cells. *J. Virol.*, 41 (1982) 1109-1111

Bayliss, G.J. and Wolf, H.: Epstein-Barr virus-induced cell fusion. *Nature*, 287 (1980) 164-165

Bayliss, G.J. and Wolf, H.: The regulated expression of Epstein-Barr virus. III. Proteins specified by EBV during the lytic cycle. *J. Gen. Virol.*, 56 (1981) 105-118

Bayliss, G.J. and Wolf, H.: The regulated expression of Epstein-Barr virus. Evidence that the transition from primary to secondary protein synthesis in Raji cells superinfected with Epstein-Barr virus requires the synthesis of new RNA. *Med. Microbiol. Immunol.*, 176 (1987) 99-102

Bayliss, G.J., Deby, G. and Wolf, H.: An immunoprecipitation blocking assay for the analysis of EBV induced antigens. *J. Virol. Meth.*, 7 (1983) 229-239

Beisel, C., Tanner, J., Matsuo, T., Thorley-Lawson, D., Kezdy, F. and Kieff, E.: Two major outer envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus are encoded by the same gene. *J. Virol.*, 54 (1985) 665-674

Bernheim, A., Berger, R. and Lenoir, G.: Cytogenetic studies on African Burkitt's lymphoma cell lines t(8;14), t(2;8) and t(8;22). *Cancer Genet. Cytogenet.*, 15 (1981) 302-315

Biggar, R.J., Henle, W., Fleisher, G., Bocker, J., Lennette, E.T. and Henle, G.: Primary Epstein-Barr virus infections in African infants: I. Decline of maternal antibodies and time of infection. *Int. J. Cancer*, 22 (1978) 239-243

Bornkamm, G.W., Hudewentz, J., Freese, U.K. and Zimmer, U.: Deletion of the non-transforming Epstein-Barr virus strain P3HR1 causes fusion of the large internal repeat to the DS_L region. *J. Virol.*, 43 (1982) 952-968

Borysiewicz, L.K., Haworth, S.J., Cohen, J., Muddin, J., Rickinson, A.B. and Sisson, J.P.: Persistence of symptoms following primary Epstein-Barr virus infection associated with impaired virus specific immune responses. *Q. J. Med.* (1985)

Burkitt, D.: Determining the climatic limitation of a children's cancer common in Africa. *Br. Med. J.*, 2 (1962) 1019-1023

Burkitt, D.: Long term remissions following one and two-dose chemotherapy for African lymphoma. *Cancer*, 20 (1967) 756-759

Carter, R.L.: Antibody formation in infectious mononucleosis . II. Other 19S antibodies and false-positive serology. *Br. J. Hematol.*, 12 (1966) 268-275

Chou, P.J. and Fasman, G.D.: Conformational parameters for amino acids helical, β -sheet and random coil regions. *Biochemistry*, 13 (1974a) 211-222

Chou, P.J. and Fasman, G.D.: Prediction of protein conformation. *Biochemistry*, 13 (1974b) 222-245

Cohen, G.H., Dietzschold, B., Ponce de Leon, M., Long, D., Golub, E., Varrichio, A., Preira, L. and Eisenberg, R.J.: Localization and synthesis of an antigenic determinant of Herpes Simplex virus glycoprotein D that stimulates the production of neutralizing antibody. *J. Virol.*, 49 (1984) 102-108

Dambaugh, T. and Kieff, E.: Identification and nucleotide sequences of two similar tandem direct repeats in Epstein-Barr virus DNA. *J. Virol.*, 44 (1982) 823-833

Davidsohn, I. and Nelson, D.A.: The blood. In: Todd-Sanford's clinical diagnosis by laboratory methods, 14th ed., Davidsohn, I., Henry, J.B. (eds.): Chap. 5, Philadelphia: Saunders, (1969)

De Schryver, A., Friberg, S.J., Klein, G., Henle, W., Henle, G., de The, D., Clifford, P. and Ho, H.C.: Epstein-Barr virus-associated antibody patterns in carcinoma of the postnasal space. *Clin. Exp. Immun.*, 5 (1969) 443-459

De The, G., Ho, J.H.C., Ablashi, D.V., Day, N.E., Macario, A.J.L., Martin-Berthelon, M.C., Pearson, G. and Sohler, R.: Nasopharyngeal carcinoma. IX. Antibodies to EBNA and correlation with response to other EBV antigens in Chinese patients. *Int. J. Cancer*, 16 (1975) 713-721

Desgranges, C. and de The, G.: IgA and nasopharyngeal carcinoma. In: *Oncogenesis and Herpesviruses III*, de The, G., Ito, Y. and Rapp, F. (eds.), Lyon: IARC (1978) 883-891

Desgranges, C., Wolf, H., de The, G., Shanmugaratnam, K., Cammoun, N., Ellouz, R., Klein, G., Lennert, K., Munoz, N. and zur Hausen, H.: Nasopharyngeal carcinoma: X. Presence of Epstein-Barr genomes in separated epithelial cells of tumors in patients from Singapore, Tunisia and Kenya. *Int. J. Cancer*, 16 (1975) 7-15

Dillner, J., Kallin, B., Alexander, H., Ernberg, I., Uno, M., Ono, Y., Klein, G. and Lerner, R.A.: An Epstein-Barr virus (EBV)-determined nuclear antigen (EBNA5) partly encoded by the transformation-associated Bam WYH region of Epstein-Barr virus DNA: Preferential expression in lymphoblastoid cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 (1986) 6641-6645

Du Bois, R.E., Seeley, J.K., Brus, I., Sakamoto, K., Ballow, M., Harada, S., Bechtold, T.A., Pearson, G. and Portilo, D.T.: Chronic mononucleosis syndrome. *South. Med. J.*, 77 (1984) 1376-1382

Edson, C.M. and Thorley-Lawson, D.A.: Epstein-Barr virus membrane antigens: characterization, distribution, and strain differences. *J. Virol.*, 39 (1981) 172-184

Edson, C.M. and Thorley-Lawson, D.A.: Synthesis and processing of the three major envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus. *J. Virol.*, 46 (1983) 547-556

Epstein, M.A., Achong, B.G. and Barr, Y.M.: Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*, i (1964) 702-703

Epstein, M.A., Morgan, A.J., Finerty, S., Randle, B.J. and Kirkwood, J.K.: Protection of cottontop tamarins against Epstein-Barr virus-induced malignant lymphoma by a prototype subunit vaccine. *Nature*, 318 (1985) 287-289

Fennewald, S., van Santen, V. and Kieff, E.: Nucleotide sequence of an mRNA transcribed in latent growth-transforming virus infection indicates that it may encode a membrane protein. *J. Virol.*, 51 (1984) 411-419

Fingeroth, J.D., Weis, J.J., Tedder, T.F., Strominger, J.L. Biro, P.A. and Fearon, D.T.: Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 (1984) 4510-4514

Fleisher, G., Henle, W., Henle, G., Lennette, E.T. and Biggar, R.J.: Primary infection with Epstein-Barr virus in infants in the United States - Clinical and serological observations. *J. Infect. Dis.*, 139 (1979) 553-558

Frade, R., Barel, M., Ehlin-Henrikson, B. and Klein, G.: Gp140, the C3d receptor of human B lymphocytes, is also the Epstein-Barr virus receptor. *Immunology*, 82 (1985) 1490-1493

Fujiki, H., Mori, M., Nakayasu, M., Terada, M. and Sugimura, T.: A possible naturally occurring tumor promotor, teleocidin B from *Streptomyces*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 90 (1979) 976-983

Fujiki, H., Mori, M., Nakayasu, M., Terada, M., Sugimura, T. and Moore, R.E.: Indole alkaloids: dihydroteleocidin B, teleocidin and lyngbyatoxin A as members of a new class of tumor promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 (1981) 3872-3876

Galloway, E.: Comparison of three slide tests for infectious mononucleosis with Davidsohn's presumptive and differential heterophil test. *Canad. J. Med. Technol.*, 31 (1969) 197-206

Gerber, P. and Monroe, J.H.: Studies on leukocytes growing in continuous culture derived from normal human donors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 40 (1968) 855-866

Geser, A., Lenoir, G., Anvret, M., Bornkamm, G., Klein, G., Williams, E.H., Wright, D.H. and de The, G.: Epstein-Barr virus markers in a series of Burkitt's lymphoma from the West Nile district of Uganda. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 19 (1983) 1393-1404

Glaser, R.: The infection of epithelial cells with Epstein-Barr virus. In: *Nasopharyngeal Carcinoma*, Prasad et al. (eds.), Current Concepts: University of Malaysia, Kuala Lumpur, 239 (1983)

Grogan, E., Miller, G., Henle, W., Rabson, M., Shedd, D. and Niederman, J.C.: Expression of Epstein-Barr viral early antigen in monolayer tissue cultures after transfection with viral DNA and DNA fragments. *J. Virol.*, 40 (1981) 861-869

Hamilton, J.K., Paquin, L.A., Sullivan, J.L., Maurer, H.S., Cruze, F.G., Provisor, A.J., Steuber, C.P., Hawkins, E., Yawn, D. and Cornet, J.A.: X-linked lymphoproliferative syndrome registry report. *J. Pediatr.*, 96 (1980) 669-673

Hanahan, S.D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166 (1973) 557-580

Hayday, A.C., Gillies, S.D., Saito, H., Wood, C., Wiman, K., Hayward, W.S. and Tonegawa, S.: Activation of a translocated human c-myc gene by an enhancer in the immunoglobulin heavy-chain locus. *Nature*, 307 (1984) 334-340

Haynes, B.F., Schooley, R.T., Payling-Wright, C.R., Grouse, J.E., Dolin, R. and Fauci, A.S.: Emergence of suppressor cells of immunoglobulin synthesis during acute Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis. *J. Immunol.*, 123 (1979) 2095-2101

Hayward, S.D., Lazarowitz, S.G. and Hayward, G.S.: Organization of the Epstein-Barr virus DNA molecule. II. Fine mapping of the boundaries of the internal repeat cluster of B95-8 and identification of additional small tandem repeats adjacent to the HR-1 deletion. *J. Virol.*, 43 (1982) 201-212

Heller, M., van Santen, V. and Kieff, E.: Simple repeat sequence in Epstein-Barr virus DNA is transcribed in latent and productive infections. *J. Virol.*, 44 (1982) 311-320

Henderson, A., Ripley, S., Heller, M. and Kieff, E.: Chromosome site for Epstein-Barr virus DNA in a Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth-transformed in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 (1983) 1987-1991

Henle, G. and Henle, W.: Epstein-Barr virus-specific serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer*, 17 (1976b) 1-7

Henle, G. and Henle, W.: Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J. Bacteriol.*, 81 (1966) 1248-1256

Henle, G. and Henle, W.: Serum IgA antibodies to Epstein-Barr virus (EBV)-related antigens a new feature of nasopharyngeal carcinoma. *Bibl. Haematol.*, 43 (1976a) 322-325

Henle, G. and Henle, W.: Observations of childhood infections with the Epstein-Barr virus. *J. Infect. Dis.*, 121 (1970) 303-310

Henle, G., Henle, W. and Diehl, V.: Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 59 (1968) 94-101

Henle, G., Henle, W. and Klein, G.: Demonstration of distinct components in the early antigen complex of Epstein-Barr virus-infected cells. *Int. J. Cancer*, 8 (1971) 272-282

Henle, W. and Henle, G.: Antibodies to the R component of EBV-induced early antigens in Burkitt's lymphoma may exceed in titer antibodies to EB viral capsid antigen. *J. Natl. Cancer Inst.*, 58 (1977) 785-786

Henle, W. and Henle, G.: Seroepidemiology of the virus. In: *The Epstein-Barr virus*, Epstein, M.A. and Achong, B.G. (eds.), Springer Verlag, New York (1979) 62-78

Henle, W., Henle, G., Andersson, J., Ernberg, I., Klein, G., Horwitz, C.A., Marklund, G., Rymo, L., Wellinger, C. and Straus, S.E.: Antibody responses to Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen (EBNA)-1 and EBNA-2 in acute and chronic Epstein-Barr virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 (1987) 570-574

Henle, W., Henle, G. and Horwitz, C.A.: Epstein-Barr virus-specific diagnostic tests in infectious mononucleosis. *Hum. Pathol.*, 5 (1974) 551-565

Henle, W., Henle, G., Gunven, P., Klein, G., Clifford, P. and Singh, S.: Patterns of antibodies to Epstein-Barr virus-induced early antigens in Burkitt's lymphoma. Comparison of dying patients with long-term survivors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 50 (1973a) 1163-1173

Henle, W., Ho, H.C., Henle, G. and Kwan, H.C.: Antibodies to Epstein-Barr virus-related antigens in nasopharyngeal carcinoma. Comparison of active cases with long term survivors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 51 (1973b) 361-369

Henle, W., Ho, H.C., Henle, G., Chau, J.C.W. and Kwan, H.C.: Nasopharyngeal carcinoma: Significance of changes in Epstein-Barr virus-related antibody patterns following therapy. *Int. J. Cancer*, 20 (1977) 663-672

Henle, W.: Evidence for a relation of the Epstein-Barr virus to Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. In: *Proceedings of the 1st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund: Recent advances in human tumor virology and immunology*, Nakahara, W., Nishioka, K., Hirayama, T. and Ito, Y. (eds.), University of Tokyo press, Tokyo, (1971) 361-367

Hennessy, K. and Kieff, E.: One of two Epstein-Barr virus nuclear antigens contains a glycine-alanine copolymer domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 (1983) 5665-5669

Hennessy, K., Fennewald, S., Hummel, M., Cole, T. and Kieff, E.: A membrane protein encoded by Epstein-Barr virus in latent growth-transforming infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 (1984) 7207-7211

Hennessy, K., Wang, F., Bushman, E.W. and Kieff, E.: Definitive identification of a member of the Epstein-Barr virus nuclear protein 3 family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 (1986) 5693-5697

Heston, L., Rabson, M., Brown, N. and Miller, G.: New Epstein-Barr virus variants from cellular subclones of P3J-HR-1 Burkitt lymphoma. *Nature*, 295 (1982) 160-163

Hinuma, Y. and Grace, J.T.: Cloning of immunoglobulin producing human leucemic and lymphoma cells in long term cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 124 (1967) 107-111

Hirayama, T. and Ito, Y.: A new view of the etiology of nasopharyngeal carcinoma. *Prev. Med.*, 10 (1981) 614-622

Ho, J.H.C., Ng, M.H., Kwan, H.C. and Chau, J.C.W.: Epstein-Barr virus-specific IgA and IgG serum antibodies in nasopharyngeal carcinoma. *Br. J. Cancer*, 34 (1976) 655-660

Ho, J.H.C.: Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *J. R. Coll. Surg. Edinb.*, 20 (1975) 223-235

Ho, J.H.C.: Nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Adv. Cancer Res.*, 15 (1972) 57-92

Hoffmann, G.J., Layarowitz, S.G. and Hayward, S.D.: Monoclonal antibodies against a 250,000-dalton glycoprotein of Epstein-Barr virus identifies a membrane antigen and a neutralizing antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 (1980) 2979-2983

Honess, R.W. and Roizman, B.: Regulation of Herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.*, 14 (1974) 8-19

Honess, R.W. and Watson, D.H.: Unity and diversity in the Herpesviruses. *J. Gen. Virol.*, 37 (1977) 15-37

Honess, R.W.: Herpes simplex and "the Herpes complex": diverse observations and a unifying hypothesis. *J. Gen. Virol.*, 65 (1984) 2077-2107

Hopp, T.P. and Woods, K.R.: Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 (1981) 2979-2983

Horwitz, C.A., Henle, W., Henle, G. and Schmitz, H.: Clinical evaluation of patients with infectious mononucleosis and development of antibodies to the R component of the Epstein-Barr virus-induced early antigen complex. *Am. J. Med.*, 58 (1975) 330-338

Hudewentz, J., Delius, H., Freese, U.K., Zimmer, U. and Bornkamm, G.W.: Two distant regions of the Epstein-Barr virus genome with sequence homologies have the same orientation and involve small tandem repeats. *The EMBO J.*, 1 (1982) 21-26

Hummel, M., Thorley-Lawson, D. and Kieff, E.: An Epstein-Barr virus DNA fragment encodes messages for the two major envelope glycoproteins (gp350/300 and gp220/200). *J. Virol.*, 49 (1984) 413-417

Ito, Y., Yanase, S., Tokuda, H., Kishishi, M., Ohigashi, H., Hirota, M. and Koshimiz., K.: Epstein-Barr virus activated by tung oil, extracts of *Aleurites fordii* and its diterpene ester 12-O-hexadecanoyl-16-hydroxyphorbol-13-acetate. *Cancer Lett.*, 18 (1983) 87-95

Jeang, K.T. and Hayward, S.D.: Organization of the Epstein-Barr virus DNA molecule. III. Location of the P3HR1 deletion junction and characterization of the NotI repeat units that form part of the template for an abundant 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced mRNA transcript. *J. Virol.*, 48 (1983) 135-148

Jilg, W. and Wolf, H.: Diagnostic significance of antibodies to the Epstein-Barr virus-specific membrane antigen gp250. *J. Infect. Dis.*, 152 (1985) 222-225

Kallin, B. and Klein, G.: Epstein-Barr virus carried by Raji cells: a mutant in early functions? *Intervirology*, 19 (1983) 47-51

Kallin, B., Dillner, J., Ernberg, I., Ehlin-Henriksson, B., Rosen, A., Henle, W., Henle, G. and Klein, G.: Four virally determined nuclear antigens are expressed in Epstein-Barr virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 (1986) 1499-1503

Kallin, B., Luka, J. and Klein, G.: Immunochemical characterization of Epstein-Barr virus-associated early and late antigens in n-butyrate-treated P3HR1 cells. *J. Virol.*, 32 (1979) 710-716

Kawanishi, M., Sugawara, K. and Ito, Y.: Epstein-Barr virus-induced early polypeptides: a comparative study with superinfected Raji, IUdR-treated, and N-butyrate-treated P3HR1 cells. *Virology*, 109 (1981) 72-81

Klein, G., Giovanella, B.C., Lindahl, T., Fialko, P.J., Singh, S. and Stehlin, J.S.: Direct evidence for the presence of EBV DNA and nuclear antigen in malignant epithelial cells from patients with poorly differentiated carcinoma of the nasopharynx. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71 (1974) 4737-4741

Krech, U.: Zytomegalie. In: *Klinische Virologie*, Gsell, O., Krech, U. und Mohr, W. (eds.), Urban & Schwarzenberg, (1986) 255-262

Krüger, G.R.F., Kottaridis, S.D., Wolf, H., Ablashi, D.V., Sesterhenn, K. and Bertram, G.: Histological types of Nasopharyngeal Carcinoma as compared to EBV serology. *Anticancer Research*, 1 (1981) 187-194

Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (1970) 680-685

Lee, C.L. and Davidsohn, I.: *Serologic test for infectious mononucleosis*. Chicago: American Society of Clinical Pathologists Commission on Continuing Education (1972)

Lee, C.L., Davidsohn, I. and Panczyszyn, O.: Horse agglutinins in infectious mononucleosis. II. The spot test. *Am. J. Clin. Pathol.*, 49 (1968) 12-18

Lenoir, G.M., Philip, T. and Sohier, R.: Burkitt-type lymphoma - Epstein-Barr virus association and cytogenetic markers in cases from various geographic locations. In: Pathogenesis of Leukemias and Lymphomas: Environmental Influences, Magrath, I.T., O'Connor, G.T. and Ramot, B. (eds.), Raven press, New York, (1984) 283-295

Luthardt, Th.: Pränatale und perinatale Virusinfektionen. In: Klinische Virologie, Gsell, O., Krech, U. und Mohr, W. (eds.), Urban & Schwarzenberg, München, (1986) 263-274

Lynn, T.C., Tu, S.M., Hirayama, T. and Kawamura, A.J.: Nasopharyngeal carcinoma and Epstein-Barr virus. II. Clinical course and the anti-VCA antibody. Jap. J. Exp. Med., 43 (1973) 121-123

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.: Molecular cloning. Cold Spring Harbor (1982)

Manolov, G. and Manolova, Y.: Marker band in one chromosome 14 from Burkitt lymphomas, Nature, 237 (1972) 33-34

Mark-Vendel, E., Philip, T., Ladjadj, Y., Aboulola, M. and Lenoir, G.M.: Chromosomal translocation in Algerian Burkitt's lymphoma. Lancet, i, (1983) 788

Markert, C., Jilg, W., Modrow, S., Meerwarth, I., Mairhofer, H., Voltz, R. and Wolf, H.: Differential expression of EB-viral and cellular surface markers on Burkitt's lymphoma and lymphoblastoid cell lines. XVIIth Meeting of the European Tumor Virus Group, Dresden (1987)

Marston, F.A.O., Lowe, P.A., Doel, M.T., Schoemaker, J.M., White, S. and Angal, S.: Purification of calf prochymosin (prorennin) synthesized in Escherichia coli. Bio/Technology, 2 (1984) 800-804

Masucci, M.G., Szigeti, R., Ernberg, I. et al.: Cellular immune defects to Epstein-Barr virus -determined antigens in young males. *Cancer Res.*, 41 (1981) 4284-4291

Matsuo, T., Heller, M., Petti, P., O'Shiro, E. and Kieff, E.: Persistence of the entire Epstein-Barr virus genome integrated into human lymphocyte DNA. *Science* (1984) 1322-1325

Maurer, H.R.: *Disc electrophoresis*, Berlin-New York (1971)

Menezes, J., Leibold, W., Klein, G. and Clements, G.: Establishment and characterization Epstein-Barr virus negative lymphoblastoid B cell line (BJAB) from an exceptional EBV genome negative African Burkitt's lymphoma. *Biomedicine*, 22 (1975) 276-284

Micheau, C., Rilke, F. and Pilotti, S.: Proposal for a new histopathological classification of the carcinomas of the nasopharynx. *Tumori*, 64 (1978) 513-518

Miller, G., Rabson, M. and Heston, L.: Epstein-Barr virus with heterogenous DNA disrupts latency. *J. Virol.*, 50 (1984) 174-182

Miller, G., Shope, T., Lisco, H., Stitt, D. and Lipman, M.: Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69 (1972) 383-387

Mishell, B.B. and Shiigi, S.M.: *Selected methods in cellular immunology*. Freeman & Co., (1980) 412-440

Miyoshi, I., Hamasaki, K., Miyamoto, K., Nagase, K., Narahara, K., Kitajima, K., Kimura, I. and Sato, J.: Chromosome translocations in Burkitt's lymphoma. *N. Engl. J. Med.*, 304 (1981) 734

Miyoshi, I., Hiraki, S., Kimura, I., Miyamoto, K. and Sato, J.: 2/8 translocation in a Japanese Burkitt's lymphoma. *Experientia*, 35 (1979) 742-743

Modrow, S. and Wolf, H.: Characterization of two related Epstein-Barr virus encoded proteins by synthetic oligopeptides, which are differentially expressed in Burkitt's lymphoma and in vitro transformed cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 (1986) 5703-5707

Modrow, S., Höflacher, B. and Wolf, H.: Use of carrier-bound oligopeptides as antigens for HIV-1 and HIV-2 specific diagnostic ELISA tests. *DGHM Meeting, Heidelberg* (1987)

Morgan, A.J., Smith, A.R., Barker, R.N. and Epstein, M.A.: A structural investigation of the Epstein-Barr (EB) virus membrane antigen glycoprotein, gp340. *J. Gen. Virol.*, 65 (1984) 397-404

Moss, D.J., Rickinson, A.B. and Pope, J.H.: Longterm T-cell mediated immunity to Epstein-Barr virus in man. *Int. J. Cancer*, 22 (1978) 662-668

Motz, M., Fan, J., Jilg, W. and Wolf, H.: Expression of Epstein-Barr virus-encoded proteins. In: *Vaccines 86: New Approaches to Immunization*. Brown, F., Chanock, R.M. and Lerner, R.A. (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1985a) 275-282

Motz, M., Fan, J., Seibl, R., Jilg, W. and Wolf, H.: Expression of the Epstein-Barr virus 138kDa early protein in *Escherichia coli* for the use as antigen in diagnostic tests. *Gene*, 42 (1986) 303-312

Motz, M., Fan, J. and Wolf, H.: Expression des Membranproteins gp250/350 von EBV in *E.coli*. *DGHM Meeting, Erlangen* (1985b) p79

Motz, M: Gentechnologische Herstellung Epstein-Barr viraler Proteine für Diagnostik und Prävention. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1986)

Mueller-Lantzsch, N., Yamamoto, N. and zur Hausen, H.: Analysis of early and late Epstein-Barr virus associated polypeptides by immunoprecipitation. *Virology*, 97 (1979) 378-387

Muir, C.S.: Nasopharyngeal carcinoma in non-Chinese populations with special reference to South-East Asia and Africa. *Int. J. Cancer*, 8 (1971) 351-363

Nevo, S., Meyer, W. and Altman, M.: Carcinoma of nasopharynx in twins. *Cancer*, 28 (1971) 807-809

Niederman, J.C., Evans, A.S. Subrahmanyam, L. and McCollum, R.W.: Prevalence, incidence and persistence of EB virus in young adults. *New Eng. J. Med.*, 282 (1970) 361-365

Nonoyama, M. and Pagano, J.S.: Detection of EBV genome in non-productive cells. *Nature*, 233 (1971) 103-105

Nonoyama, M., Huang, D.P., Pagano, J.S., Klein, G. and Singh, S.: DNA of Epstein-Barr virus detected in tissue of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70 (1973) 3265-3268

North, J.R., Morgan, A.J., Thompson, J.L. and Epstein, M.A.: Purified EB virus gp340 induces potent virus-neutralizing antibodies when incorporated in liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 (1982) 7504-7508

O'Connor, G.T., Rappaport, H. and Smith, E.B.: Childhood lymphoma resembling "Burkitt tumor" in the United States. *Cancer*, 18 (1985) 411-417

Paul, J.R. and Bunell, W.W.: The presence of heterophil antibodies in infectious mononucleosis. *Am. J. Med. Sci.*, 183 (1932) 80-104

Pearson, G.R., Vroman, B., Chase, B., Sculley, T., Hummel, M. and Kieff, E.: Identification of polypeptide components of the Epstein-Barr virus early antigen complex with monoclonal antibodies. *J. Virol.*, 47 (1983) 193-201

Philip, T., Lenoir, G.M., Bryon, P.A., Gerardma., R., Sonillet, G., Philippe, N., Freycon, F. and Brunatme, M.: Burkitt-type lymphoma in France among non-Hodgkin malignant lymphomas in Caucasian children. *Br. J. Cancer*, 45 (1982) 670-678

Pi, G.H., Zeng, Y. and Wolf, H.: Detection of IgA antibody to Epstein-Barr virus membrane antigen using Staph. aureus preadsorbed sera is closely associated with Nasopharyngeal carcinoma. *J. Virol. Meth.*, 15 (1987) 33-39

Pulvertaft, R.J.V.: A study of malignant tumors in Nigeria in short term tissue culture. *J. of Clin. Path.*, 18 (1965) 261-273

Pulvertaft, R.J.V.: Cytology of Burkitt's tumor (African lymphoma). *Lancet*, i (1964), 238-240

Purtilo, D.T. (ed.): Immunodeficiency and cancer: Epstein-Barr virus and lymphoproliferative malignancies. Plenum press, New York (1984) 1-488

Purtilo, D.T., Sakamoto, K., Barnabei, V., Seeley, J., Bechthold, T., Rogers, G., Yetz, J. and Harada, S.: Epstein-Barr virus-induced diseases in boys with the X-linked lymphoproliferative syndrome. *Am. J. Med.*, 73 (1982) 49-56

Purtilo, D.T.: Epstein-Barr virus-induced oncogenesis in immunodeficiency individuals. *Lancet*, i (1980) 300-303

Qualtiere, L.F. and Pearson, G.R.: Radioimmunoprecipitation study comparing the Epstein-Barr virus membrane antigens expressed on P3HR1 virus-superinfected Raji cells to those expressed on cells in a B95-8 virus-transformed producer culture activated with tumor-promoting agent (TPA). *Virology*, 102 (1980) 360-369

Qualtiere, L.F. and Pearson, G.R.: Epstein-Barr virus-induced membrane antigens: immunochemical characterization of Triton X100 solubilized viral membrane antigens from EBV-superinfected Raji cells. *Int. J. Cancer*, 23 (1979) 808-817

Raab-Traub, N., Pritchett, R and Kieff, E.: DNA of Epstein-Barr virus. III. Identification of restriction enzyme fragments that contain DNA sequences which differ among strains of Epstein-Barr virus. *J. Virol.*, 27 (1978) 388-398

Rabson, M., Heston, L. and Miller, G.: Identification of a rare Epstein-Barr virus variant that enhances early antigen expression in Raji cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 (1983) 2762-2766

Rawlins, D.R., Milman, G., Hayward, S.D. and Hayward, G.S.: Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell*, 42 (1985) 859-868

Reedman, B.N. and Klein, G.: Cellular localisation of an Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. *Int. J. Cancer*, 11 (1973) 499-520

Rickinson, A.B., Moss, D.J. and Pope, J.H.: Longterm T-cell-mediated immunity to Epstein-Barr virus in man: II. Components necessary for regression in virus-infected leukocyte cultures. *Int. J. Cancer*, 23 (1979) 610-617

Rickinson, A.B., Wallace, L.E. and Epstein, M.A.: HLA-restricted T-cell recognition of Epstein-Barr virus-infected B cells. *Nature*, 238 (1980) 865-867

Rickinson, A.B., Young, L.S. and Rowe, M.: Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J. Virol.*, 61 (1987) 1310-1317

Roizman, B. and Batterson, W.: Herpesviruses and their replication, In: *Virology*, Fields, B.N. (ed.), Raven press, New York (1985)

Roizman, B., Carmichael, L.E., Deinhardt, F., de The, G., Nahmias, A.J., Plowright, W., Rapp, F., Sheldrick, P., Takahashi, M. and Wolf, K.: *Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy.* *Intervirology*, 16 (1981) 201-217

Rumpold, H., Rhodes, G.H., Bloch, P.L., Carson, D.A. and Vaughan, J.H.: The glycine-alanine repeating region is the major epitope of the Epstein-Barr nuclear antigen-1 (EBNA-1). *J. Immunol.*, 138 (1987) 593-599

Sassenfeld, H.M. and Brewer, S.J.: A polypeptide fusion designed for the purification of recombinant proteins. *Bio/Technology*, 2 (1984) 76-81

Seibl, R: Kartierung von Epstein-Barr Virus Proteinen auf dem Genom und Untersuchungen zu deren Expression (Dissertation), (1985)

Seibl, R. and Wolf, H.: Mapping of Epstein-Barr virus proteins on the genome by translation of hybrid-selected RNA from induced P3HR1 cells and induced Raji cells. *Virology*, 141 (1985) 1-13

Shanmugaratnam, K., Chan, S.H., De The, G., Goh, J.E.H., Khor, T.H., Simons, M.J. and Tye, C.Y.: Histopathology of Nasopharyngeal Carcinoma. Correlations with epidemiology, survival rates and other biological characteristics. *Cancer*, 44 (1979) 1029-1044

Shanmugaratnam, K. and Muir, C.S.: The incidence of nasopharyngeal cancer in Singapore. In: Cancer of the nasopharynx, Muir, C.S. and Shanmugaratnam, K. (eds.), Copenhagen: Munksgaard (1967) 47-53

Shanmugaratnam, K.: Studies on the etiology of nasopharyngeal carcinoma. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 10 (1971) 361-413

Simons, M.J.: Genetic aspects of EBV-associated malignancies. In: Epstein-Barr Virus and Associated Diseases. Levine, P.H., Ablashi, D.V., Pearson, G.R. and Kottaridis, S.D. (eds.), Martin Nijhoff Publishing, Boston (1985) 90-105

Smith, J.C. Derbyshire, R.B. Cook, E., Dunthorne, L., Viney, J., Brewer, S.J., Sassenfeld, H.M. and Bell, L.D.: Chemical synthesis and cloning of a poly(arginine)-coding gene fragment designed to aid polypeptide purification. *Gene*, 32 (1984) 321-327

Strnad, B.C., Schuster, T., Klein, R., Hopkins III, R.F., Witmer, T., Neubauer, R.H. and Rabin, H.: Production and characterisation of monoclonal antibodies against the Epstein-Barr virus membrane antigen. *J. Virol.*, 41 (1982) 258-264

Strnad, B.C., Schuster, T.C., Hopkins, R.F., Neubauer, R.H. and Rabin, H.: Identification of an Epstein-Barr virus nuclear antigen by fluoroimmuno-electrophoresis and radioimmuno-electrophoresis. *J. Virol.*, 38 (1981) 996-1004

Sugden, B., Yates, J. and Mark, W.: Transforming functions associated with Epstein-Barr virus. *J. Invest. Derm.*, 83 (1984) 82s-87s

Sullivan, J.L., Byron, K.S., Brewster, F.E. and Purtilo, D.T.: Deficient natural killer cell activity in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Science*, 210 (1980) 543-545

- Svedmyr, E. and Jondal, M.: Cytotoxic effector cells specific for B-cell lines transformed by Epstein-Barr virus are present in patients with infectious mononucleosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72 (1975) 1622-1626
- Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S. and Leder, P.: Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine-plasmacytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 7837-7841
- Taub, R., Moulding, C., Battey, J., Murphy, W., Vasicek, T., Lenoir, G.M. and Leder, P.: Activation and somatic mutation of the translocated c-myc gene in Burkitt lymphoma cells. *Cell*, 36 (1984) 339-348
- Thorley-Lawson, D.A. and Edson, C.M.: The polypeptides of the Epstein-Barr virus membrane antigen complex. *J. Virol.*, 32 (1979) 458-467
- Thorley-Lawson, D.A. and Geilinger, K.: Monoclonal antibodies against the major glycoprotein (gp350/220) of Epstein-Barr virus neutralize infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 (1980) 5307-5311
- Thorley-Lawson, D.A.: The transformation of adult but not newborn human lymphocytes by Epstein-Barr virus and phytohemagglutinin is inhibited by interferon: The early suppression by T cells of Epstein-Barr infection is mediated by interferon. *J. Immunol.*, 126 (1981) 829-833
- Tobi, M., Ravid, Z., Feldman, V., Benchet, E., Morag, A., Chowers, I., Michaeli, Y., Shabit, M. and Knobler, H.: Prolonged atypical illness associated with serological evidence of persistent Epstein-Barr virus infection. *Lancet*, i (1982) 61-64
- Tosato, G. and Blaese, R.M.: Epstein-Barr virus infection and immunoregulation in man. *Adv. Immunol.* 37 (1985) 99-149

Tosato, G., Magrath, I., Koski, I., Dooley, N. and Blaese, M.: Activation of suppressor T cells during Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis. *N. Engl. J. Med.*, 301 (1979) 1133-1137

Vieira, J. and Messing, J.: The pUC plasmids, a M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, 19 (1982) 259-268

Wang, F., Gregory, C.D., Rowe, M., Rickinson, A.B., Wang, D., Birkenbach, M., Kikutani, H., Kishimoto, T. and Kieff, E.: Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 (1987a) 3452-3456

Wang, F., Petti, L., Braun, D., Seung, S. and Kieff, E.: A bicistronic Epstein-Barr virus mRNA encodes two nuclear proteins in latently infected, growth-transformed lymphocytes. *J. of Virology*, 61 (1987) 945-954

Williams, E.H. and de The, G.: Familial aggregation in nasopharyngeal carcinoma. *Lancet*, ii (1974) 295-296

Wolf, H. and Roizman, B.: The regulation of gamma (structural) polypeptide synthesis in Herpes Simplex virus types 1 and 2 infected cells. In: *Oncogenesis and Herpesviruses III*, part 1, De The et al. (eds.), Lyon, (1978) 327-336

Wolf, H., Haus, M. and Wilmes, E.: Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland. *J. Virol.*, 51 (1984) 795-798

Wolf, H., Modrow, S., Motz, M., Jameson, B., Hermann, G. and Förtsch, B.: An integrated family of amino acid sequence analysis programs. *CABIOS* (1987) in press

Wolf, H., Motz, M., Modrow, S., Seibl, R., Ebbers, J. and Zeng, Y.: Epstein-Barr virus-related diseases and their control. IXth International Congress of Infectious and Parasitic Diseases, Munich, (1986) #1207

Wolf, H., zur Hausen, H. and Becker, V.: EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature New Biology*, 244 (1973) 245-247

Wolf, H., zur Hausen, H., Klein, G., Becker, V., Henle, G. and Henle, W.: Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors. III. Epstein-Barr viral DNA in non-lymphoid nasopharyngeal carcinoma cells. *Med. Microbiol. Immunol.* 161 (1975) 15-21

Yamamoto, N. and zur Hausen, H.: Tumor promotor TPA enhances transformation of human lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Nature*, 280 (1979) 244-245

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33 (1985) 103-119

Yates, J., Warren, N. and Sugden, B: Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*, 313 (1985) 812-815

Zeng, Y. Liu, Y.X. Wei, J.N., Zhu, J.S., Cai, S.L., Wang, P.Z., Zhong, J.M., Li, R.C., Pan, W.C., Li, E.J. and Tan, B.F.: Serological mass survey of nasopharyngeal carcinoma. *Acta. Acad. Med. Sin.*, 1 (1979) 123-126

Zeng, Y. and de The, G.: Nasopharyngeal carcinoma; early detection and IgA-related per-nasopharyngeal carcinoma condition, achievements and prospectives. In: Epstein-Barr virus and associated diseases, Levine, P.H., Ablashi, D.V., Pearson, G.R. and Kottaridis, S.D. (eds.), Martinus Nijhoff Publishing, (1985) 151-164

Zeng, Y., Gong, C.H., Jan, M.G., Fun, Z., Zhang, L.G. and Li, H.Y.: Detection of Epstein-Barr virus IgA/EA antibody for diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by immunoautoradiography. *Int. J. Cancer*, 31 (1983a) 599-601

Zeng, Y., Zhang, L., Wu, Y., Huang, Y., Huang, N., Li, J., Wang, Y., Jiang, M., Fang, Z. and Meng, N.: Prospective studies on nasopharyngeal carcinoma in Epstein-Barr virus IgA/VCA antibody-positive persons in Wu-Zhou City, China. *Int. J. Cancer* 36 (1985) 545-547

Zeng, Y., Zhang, L.G., Li, H.Y., Jan, M.G., Zhang, Q., Wu, Y.C., Wang, Y.S. and Su, G.R.: Serological mass survey for early detection of nasopharyngeal carcinoma in Wu-Zhou City, China. *Int. J. Cancer*, 29 (1982) 139-141

Zeng, Y., Zhong, J.M., Mo, Y.K. and Miao, X.C.: Epstein-Barr virus early antigen induction in Raji cells by Chinese medicinal herbs. *Intervirolgy*, 19 (1983b) 201-204

Zeng, Y.: Seroepidemiological studies on nasopharyngeal carcinoma in China. *Advan. Cancer Res.*, 44 (1985) 121-136

Zhu, J.S., Zeng, Y. and Wolf, H.: Detection of IgG and IgA antibodies to Epstein-Barr virus membrane antigen in the sera from patients with nasopharyngeal carcinoma and normal individuals. *Int. J. Cancer*, 37 (1986) 689-691

zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., et al.: EBV DNA in biopsies of Burkitt's tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature (Lond.)*, 228 (1970) 1056-1058

Eigene Veröffentlichungen:

Jilg, W., Kühbeck, R. and Wolf, H.: Antibodies against EBV-specific proteins in acute and latent EBV infections. IXth International Herpesvirus Workshop, Seattle, (1984) p.181

Jilg, W., Kühbeck, R. and Wolf, H.: Antibodies against EBV-specific proteins in acute and latent EBV infections. 6th International Congress of Virology, Sendai, Japan (1984) p.34

Kühbeck, R., Krech, T. und Wolf, H.: Untersuchungen von Kreuzreaktionen zwischen EBV und CMV. DGHM Meeting, Erlangen (1985) p.111

Kühbeck, R., Morgenstern, H., Koldovsky, P., Motz, M. and Wolf, H.: Diagnosis of Epstein-Barr virus with recombinant antigens in comparison with conventional methods. DGHM Meeting, Martinsried (1987)

Kühbeck, R., Motz, M., Jilg, W. and Wolf, H.: Diagnosis of EBV-correlated infections with recombinant gene products of EBV. Zbl. Bakt. A., 267 (1987) 108

Wilske, B., Schierz, G., Preac-Mursic, V., von Busch, K., Kühbeck, R., Pfister, H.W. and Einhäupl, K.: Intrathecal production of specific antibodies against *Borrelia burgdorferi* in patients with lymphocytic meningoradiculitis (Bannwarth's syndrome). J. Inf. Dis., 153 (1986) 304-314

Wilske, B., Preac-Mursic, V., Schierz, G., Kühbeck, R., Barbour, A.G. and Kramer, M.: Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. Ann. NY Acad. Sci., in press

Wolf, H., Motz, M., Kühbeck, R., Jilg, W., Fan, J., Pi, G.H. and Zeng, Y.: Development of a set of EBV-specific antigens with recombinant gene technology for diagnosis of EBV-related malignant or nonmalignant diseases. In: EBV and Its Diseases, Levine, P.H., Ablashi, D.V., Nonoyama, M., Pearson, G.R. and Glaser, R. (eds.), Humana Press, New Jersey (1987) 179-182

Wolf, H., Motz, M., Kühbeck, R., Modrow, S., Fan, J. and Zeng, Y.: Selection and production by genetchnological methods of medically relevant EBV-related antigens. Proceedings of the 3rd SEK Symposium. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 109 (1985) A55

Wolf, H., Motz, M., Kühbeck, R., Seibl, R., Bayliss, G.J., Modrow, S. and Fan, J.: Selection and production by gentechnological methods of medically relevant EBV antigens. In: Epstein-Barr Virus and Associated Diseases. Levine, P.H., Ablashi, D.V., Pearson, G.R. and Kottaridis, S.D. (eds.), Martin Nijhoff Publishing, Boston (1985) 485-494

Wolf, H., Motz, M., Kühbeck, R., Seibl, R., Jilg, W., Bayliss, G., Barrell, B., Golub, B., Zeng, Y. and Gu, Y.: Strategies for the economic preparation of Epstein-Barr virus proteins of diagnostic and protective value by genetic engineering: A new approach based on segments of virus encoded gene products. In: Virus-associated cancers in Africa. Williams, A.O., O'Conner, G.T., de The, G. and Johnson, C.A. (eds.), IARC Scientific Publications 63, Oxford University Press (1984) 525-539

Wolf, H., Motz, M., Modrow, S., Jilg, W., Seibl, R., Kühbeck, R., Fan, J. and Zeng, Y.: Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. In: Viruses in Human Tumors. Contributions to Oncology 24. Hofschneider, P.H. and Munk, K. (eds.), Karger Verlag, Basel (1987) 142-157

Danksagung:

Herrn Prof. Dr. Hans Wolf danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, für die finanzielle Unterstützung und für die theoretische Betreuung der Arbeit.

Den Herren Prof. Dr. W. Lubitz und Prof. Dr. Dr. F. Schwarzfischer danke ich sehr herzlich für die Vertretung der Arbeit vor dem Fachbereich Biologie.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Deinhardt danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Meinen Mann, Herrn Dipl. Biol. Klaus Fuchs, danke ich ganz herzlich für seine fachliche und menschliche Unterstützung über all die Jahre hinweg.

Herrn Dr. Manfred Motz danke ich vielfach für die Überlassung der rekombinanten Antigene und seine Unterstützung bei den Klonierungsexperimenten.

Herrn Dr. Gary Bayliss danke ich im Besonderen für seine Anregungen und Diskussionen.

Herrn Dr. Wolfgang Jilg und Frau Helga Mairhofer danke ich für die Durchführung der Tierexperimente und die Herstellung der monoklonalen Antikörper.

Frau Helga Schmid danke ich ganz herzlich für die Durchführung aller fotografischen Arbeiten, die für die Anfertigung der Dissertation nötig waren.

Allen Kollegen der Arbeitsgruppe Molekulare Virologie und Freunden am Max von Pettenkofer Institut danke ich für ihre gute Zusammenarbeit, ihre Gesprächsbereitschaft und ihre nützlichen Anregungen.

Die Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung des Bundesministeriums für Forschung und Technologie (BMFT 01 ZR 85069, 01 ZR 102/5, 01 ZR 8609/5) angefertigt.

Lebenslauf:

Name:	Renate Amalie Fuchs, geb. Kühbeck
geboren:	02.10.1956, München
Staatsangehörigkeit:	Deutsche
Familienstand:	verheiratet seit 31.8.1988
Ehemann:	Klaus Fuchs, Dipl.-Biologe
Eltern:	Germunt Kühbeck, Architekt Christine Kühbeck, Buchhalterin
Schule:	
1963-1967	Volksschule am Winthirplatz
1967-1976	Städt. Louise-Schröder-Gymnasium (neusprachlich)
Studium:	
1976-1981	Ludwig-Maximilians-Universität München, Fachrichtung Lebensmittelchemie
Juni 1981	1. Staatsprüfung
1982	Ausbildung am Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern, Erlangen
Dez. 1982	2. Staatsprüfung
Dissertation:	
April 1983-Nov. 1988	Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Abt. Molekulare Virologie, Prof. H.Wolf
seit Jan. 1988	Abt. Serologie, Prof. G. Schierz
Sonstige Praktika:	
Aug.-Okt. 1976	Wissenschaftliche Station für Brauerei
Nov./Dez. 1976	Paulaner Brauerei (Labor)
März 1978	Kurklinik in der Stangaß
Wintersemester 1981	Biochemiepraktikum, Prof. Winnacker
Jan.-März 1983	Großpraktikum Virologie und Molekularbiologie, Prof. Wolf

